

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-524721

(P2019-524721A)

(43) 公表日 令和1年9月5日(2019.9.5)

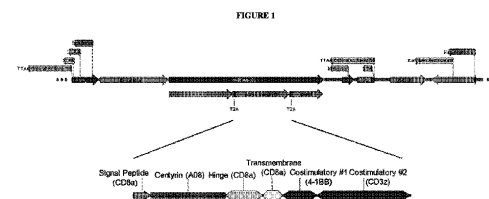
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 7 6
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867 Z	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 121 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-500821 (P2019-500821)	(71) 出願人	518002398
(86) (22) 出願日	平成29年7月17日 (2017.7.17)		ボセイダ セラピューティクス, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成31年3月8日 (2019.3.8)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121, サンディエゴ, キャンパス ポイント コート 4242, スイート 700
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/042454	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02018/014038		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成30年1月18日 (2018.1.18)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	62/362,746		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成28年7月15日 (2016.7.15)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
(31) 優先権主張番号	62/405,180	(74) 代理人	100181641
(32) 優先日	平成28年10月6日 (2016.10.6)		弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キメラ抗原受容体および使用方法

(57) 【要約】

Centyrinを含むキメラ抗原受容体 (CAR) (すなわち、CARTyrin)、本開示のCARおよびCARTyrinをコードするトランスポゾン、本開示のCARおよびCARTyrinを発現するように修飾された細胞、ならびに作製方法および養子細胞療法にそれを使用する方法を開示する。本開示は、(a) 抗原認識領域を含むエクドメイン(ectodomain)であって、抗原認識領域が少なくとも1つのCentyrinを含む、エクドメインと、(b) 膜貫通ドメインと、(c) 少なくとも1つの共刺激ドメインを含むエンドドメイン(endodomain)とを含むキメラ抗原受容体 (CAR) を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 抗原認識領域を含むエクトドメインであって、前記抗原認識領域が、少なくとも 1 つの C e n t y r i n を含む、エクトドメイン、

(b) 膜貫通ドメイン、および

(c) 少なくとも 1 つの共刺激ドメインを含むエンドドメイン
を含むキメラ抗原受容体 (C A R) 。

【請求項 2】

(a) の前記エクトドメインがシグナルペプチドをさらに含む、請求項 1 に記載の C A R。

10

【請求項 3】

(a) の前記エクトドメインが前記抗原認識領域と前記膜貫通ドメインの間にヒンジをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の C A R。

【請求項 4】

前記シグナルペプチドが、ヒト C D 2、C D 3 δ、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 ζ、C D 4、C D 8 α、C D 1 9、C D 2 8、4-1 B B または G M-C S F R シグナルペプチドをコードする配列を含む、請求項 2 または 3 に記載の C A R。

【請求項 5】

前記シグナルペプチドが、ヒト C D 8 α シグナルペプチドをコードする配列を含む、請求項 2 または 3 に記載の C A R。

20

【請求項 6】

前記シグナルペプチドが、M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P (配列番号 3) を含むアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の C A R。

【請求項 7】

前記シグナルペプチドが、a t g g c a c t g c c a g t c a c c g c c c t g c t g c t g c c t c t g g c t c t g c t g c t g c a c g c a g c t a g a c c a (配列番号 4 5) を含む核酸配列によりコードされている、請求項 5 または 6 に記載の C A R。

【請求項 8】

前記膜貫通ドメインが、ヒト C D 2、C D 3 δ、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 ζ、C D 4、C D 8 α、C D 1 9、C D 2 8、4-1 B B または G M-C S F R 膜貫通ドメインをコードする配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の C A R。

30

【請求項 9】

前記膜貫通ドメインが、ヒト C D 8 α 膜貫通ドメインをコードする配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 10】

前記膜貫通ドメインが、I Y I W A P L A G T C G V L L L S L V I T L Y C (配列番号 4) を含むアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の C A R。

【請求項 11】

前記膜貫通ドメインが、a t c t a c a t t t g g g c a c c a c t g g c c g g g a c c t g t g g a g t g c t g c t g c t g a g c c t g g t c a t c a c a c t g t a c t g c (配列番号 5) を含む核酸配列によりコードされている、請求項 9 または 10 に記載の C A R。

40

【請求項 12】

前記エンドドメインが、ヒト C D 3 ζ エンドドメインを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 つの共刺激ドメインが、ヒト 4-1 B B、C D 2 8、C D 4 0、I C O S、M y D 8 8、O X-4 0 細胞内セグメント、またはそれらの任意の組み合わせを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 14】

50

前記少なくとも１つの共刺激ドメインが、ヒトＣＤ２８および／または４－１ＢＢ共刺激ドメインを含む、前記請求項のいずれか一項に記載のＣＡＲ。

【請求項１５】

前記ＣＤ２８共刺激ドメインが、

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR（配列番号６）

を含むアミノ酸配列を含む、請求項１３または１４に記載のＣＡＲ。

【請求項１６】

前記ＣＤ２８共刺激ドメインが、

cgcggtgaagttagtcgatcagcagatgccccagcttacaaacaggacagaaccagctgtataacgagctgaatctggg
ccgcccagagaggaatatgacgtgctggataagcggagaggacgcgacccccgaaatgggaggcaagcccaggcgcaaaaacc
ctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaaaatggcagaagcctattctgagatcggcattgaagggggagcga
cggagaggcaaaaggccacgatgggctgtaccagggaactgagcaccgccacaaaggacacctatgatgctctgcatatgca
ggcactgcctccaagg（配列番号７）

を含む核酸配列によりコードされている、請求項１５に記載のＣＡＲ。

【請求項１７】

前記４－１ＢＢ共刺激ドメインが、KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTE
EEDGCS CRFP EEE EGCE L（配列番号８）を含むアミノ酸配列を含む、請
求項１３または１４に記載のＣＡＲ。

【請求項１８】

前記４－１ＢＢ共刺激ドメインが、

aagagaggcaggaagaaactgctgtatattttcaaacagcccttcatgcgccccgtgcagactaccaggaggaagacgg
gtgctcctgtcgtattccctgaggaagaggaaggcggtgtgagctg（配列番号９）

を含む核酸配列によりコードされている、請求項１７に記載のＣＡＲ。

【請求項１９】

前記４－１ＢＢ共刺激ドメインが、前記膜貫通ドメインと前記ＣＤ２８共刺激ドメイン
の間に位置する、請求項１４～１８のいずれか一項に記載のＣＡＲ。

【請求項２０】

前記ヒンジが、ヒトＣＤ８α、IgG４、および／またはＣＤ４配列に由来する配列を
含む、請求項２～１９のいずれか一項に記載のＣＡＲ。

【請求項２１】

前記ヒンジが、ヒトＣＤ８α配列に由来する配列を含む、請求項２～１９のいずれか一
項に記載のＣＡＲ。

【請求項２２】

前記ヒンジが、TTTPAPRPPTPTPTIASQPLSLRPEACRPAA
GAVHTRGLDFACD（配列番号１０）を含むアミノ酸配列を含む、請求項２０ま
たは２１に記載のＣＡＲ。

【請求項２３】

前記ヒンジが、

actaccacaccagcacctagaccaccaactccagctccaaccatcgcgagtcagccccctgagtctgagacctgaggcctg
caggccagctgcaggaggagctgtgcacaccagggcctggacttcgcctgcgac（配列番号１１）

を含む核酸配列によりコードされている、請求項２２に記載のＣＡＲ。

【請求項２４】

前記少なくとも１つのCentyrinが、タンパク質足場を含み、前記足場が、抗原
に特異的に結合することができる、前記請求項のいずれか一項に記載のＣＡＲ。

【請求項２５】

前記少なくとも１つのCentyrinが、少なくとも１つのフィブロネクチンⅡⅡ
型（FN３）ドメインのコンセンサス配列を含むタンパク質足場を含み、前記足場が、抗
原に特異的に結合することができる、前記請求項のいずれか一項に記載のＣＡＲ。

【請求項２６】

10

20

30

40

50

前記少なくとも1つのフィブロネクチンⅠⅠⅠ型(FN3)ドメインが、ヒトタンパク質に由来する、請求項25に記載のCAR。

【請求項27】

前記ヒトタンパク質が、テネイシンCである、請求項26に記載のCAR。

【請求項28】

前記コンセンサス配列が、

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGGEAINLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRS
NPLSAEFTT(配列番号1)

を含む、請求項25～27のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項29】

前記コンセンサス配列が、

MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGGEAINLTPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHR
SNPLSAEFTT(配列番号13)

を含む、請求項25～27のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項30】

前記コンセンサス配列が、

atgctgcctgcaccaaagaacctgggtgtctcatgtgacagaggatagtgccagactgtcatggactgctcccgacgc
agccttcgatagttttatcatcgtgtaccgggagaacatcgaaaccggcgaggccattgtcctgacagtgccagggtccg
aacgctcttatgacctgacagatctgaagcccggaactgagtactatgtgcagatcgccggcgtaaaggaggcaatc
agcttcctctgtccgcaatcttcaccaca(配列番号14)

を含む核酸配列によってコードされる、請求項29に記載のCAR。

【請求項31】

前記コンセンサス配列が、

(a) 前記コンセンサス配列の13～16位におけるアミノ酸残基TEDS(配列番号15)を含む、もしくはそれからなるA-Bループ、

(b) 前記コンセンサス配列の22～28位におけるアミノ酸残基TAPDAAF(配列番号16)を含む、もしくはそれからなるB-Cループ、

(c) 前記コンセンサス配列の38～43位におけるアミノ酸残基SEKVGGE(配列番号17)を含む、もしくはそれからなるC-Dループ、

(d) 前記コンセンサス配列の51～54位におけるアミノ酸残基GSEER(配列番号18)を含む、もしくはそれからなるD-Eループ、

(e) 前記コンセンサス配列の60～64位におけるアミノ酸残基GLKPG(配列番号19)を含む、もしくはそれからなるE-Fループ、

(f) 前記コンセンサス配列の75～81位におけるアミノ酸残基KGGHRSN(配列番号20)を含む、もしくはそれからなるF-Gループ、または

(g) (a)～(f)の任意の組み合わせ

の中の1つまたは複数の位置において修飾されている、請求項25～30のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項32】

少なくとも5個のフィブロネクチンⅠⅠⅠ型(FN3)ドメインのコンセンサス配列を含む、請求項25～31のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項33】

少なくとも10個のフィブロネクチンⅠⅠⅠ型(FN3)ドメインのコンセンサス配列を含む、請求項25～31のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項34】

少なくとも15個のフィブロネクチンⅠⅠⅠ型(FN3)ドメインのコンセンサス配列を含む、請求項25～31のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項35】

前記足場が、 10^{-9} Mまたはそれ未満の、 10^{-10} Mまたはそれ未満の、 10^{-11} Mまたはそれ未満の、 10^{-12} Mまたはそれ未満の、 10^{-13} Mまたはそれ未満の

10

20

30

40

50

、 10^{-14} Mまたはそれ未満の、および 10^{-15} Mまたはそれ未満の K_D から選択される少なくとも1つのアフィニティーで抗原に結合する、請求項24～34のいずれか一項に記載のCAR。

【請求項36】

前記 K_D が表面プラズモン共鳴によって決定される、請求項35に記載のCAR。

【請求項37】

前記請求項のいずれか一項に記載のCARおよび少なくとも1つの薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項38】

前記請求項のいずれか一項に記載のCARを含むトランスポゾン。

10

【請求項39】

前記トランスポゾンが、選択遺伝子をさらに含む、請求項38に記載のトランスポゾン。

【請求項40】

前記選択遺伝子が、細胞生存度および生存に不可欠な遺伝子産物をコードする、請求項39に記載のトランスポゾン。

【請求項41】

前記選択遺伝子が、選択的細胞培養条件によってチャレンジされたときの細胞生存度および生存に不可欠な遺伝子産物をコードする、請求項39に記載のトランスポゾン。

【請求項42】

前記選択的細胞培養条件が、細胞生存度または生存に有害な化合物を含み、前記遺伝子産物が前記化合物に対する耐性を付与する、請求項41に記載のトランスポゾン。

20

【請求項43】

前記選択遺伝子が、neo、DHFR（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）、TYMS（チミジル酸シンテターゼ）、MGMT（O（6）-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ）、多剤耐性遺伝子（MDR1）、ALDH1（アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリー、メンバーA1）、FRANCF、RAD51C（RAD51パラログC）、GCS（グルコシルセラミドシンターゼ）、NKX2.2（NK2ホメオボックス2）またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項39に記載のトランスポゾン。

【請求項44】

前記トランスポゾンが、
（a）リガンド結合領域と、
（b）リンカーと、
（c）切断型カスパーゼ9ポリペプチドと
を含む誘導性カスパーゼポリペプチドであって、非ヒト配列を含まない誘導性カスパーゼポリペプチドを含む、請求項38～43のいずれか一項に記載のトランスポゾン。

30

【請求項45】

前記非ヒト配列が、制限部位である、請求項44に記載のトランスポゾン。

【請求項46】

前記誘導性カスパーゼポリペプチドの前記リガンド結合領域が、FK506結合タンパク質12（FKBP12）ポリペプチドを含む、請求項44または45に記載のトランスポゾン。

40

【請求項47】

前記FK506結合タンパク質12（FKBP12）ポリペプチドのアミノ酸配列が、前記配列の36位に修飾を含む、請求項46に記載のトランスポゾン。

【請求項48】

前記修飾が、36位におけるフェニルアラニン（F）からバリン（V）への置換（F36V）である、請求項47に記載のトランスポゾン。

【請求項49】

前記FKBP12ポリペプチドが、

50

GVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNPKPFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVQRAKLTI SPDY
AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE (配列番号 2 3)

を含むアミノ酸配列によりコードされている、請求項 4 6 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の
トランスポゾン。

【請求項 5 0】

前記 F K B P 1 2 ポリペプチドが、

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTACCCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGGGGCCAGACTTGCCTCGTGCATTACAC
CGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTGGACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGG
AAGTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCCAAACTGACCATTAGCCCTGACTAC
GCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATCATTTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGATGTGGAAGCTGCTGAAGCTGGA
G (配列番号 2 4)

10

を含む核酸配列によりコードされている、請求項 4 9 に記載のトランスポゾン。

【請求項 5 1】

誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのリンカー領域が、G G G G S (配列番号 2 5)
)を含むアミノ酸によりコードされている、請求項 4 4 ~ 5 0 のいずれか一項に記載のト
ランスポゾン。

【請求項 5 2】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの前記リンカー領域が、G G A G G A G G
A G G A T C C (配列番号 2 6)を含む核酸配列によりコードされている、請求項 5 1 に
記載のトランスポゾン。

20

【請求項 5 3】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの前記切断型カスパーゼ 9 ポリペプチドが
、配列の 8 7 位にアルギニン (R) を含まないアミノ酸配列によりコードされている、請
求項 4 4 ~ 5 2 のいずれか一項に記載のトランスポゾン。

【請求項 5 4】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの前記切断型カスパーゼ 9 ポリペプチドが
、配列の 2 8 2 位にアラニン (A) を含まないアミノ酸配列によりコードされている、請
求項 4 4 ~ 5 3 のいずれか一項に記載のトランスポゾン。

【請求項 5 5】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの前記切断型カスパーゼ 9 ポリペプチドが

30

、
GFGDVGALSLRGNADLAYISLMEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLFHFMVEVKGDLTAKKMVL
ALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDCGPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDH
GFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGRLTFDQLDAISSLPSPDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQW
AHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS (配列番号 2 7)

を含むアミノ酸によりコードされている、請求項 4 4 ~ 5 4 のいずれか一項に記載のト
ランスポゾン。

【請求項 5 6】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの前記切断型カスパーゼ 9 ポリペプチドが

40

、
TTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACATCCTGAGCATGGAACCCCTGCGGCCA
CTGTCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTGCGAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATATTGACTGTGAGA
AGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCTGAAAGTGAAGGGGATCTGACCGCCAAGAAAATGGTGTGCGCC
CTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATGGAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCTGATCCTGTCCACGGGTGCCAGGCTTC
TCATCTGCAGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCTCTGTCAGCGTGGAGAAGATCGTCAACATCTTCAACG
GCACTTCTTGGCCTAGTCTGGGGGAAAAGCCAAAAGTGTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCACGGC
TTCGAGGTGGCCAGCACCGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCCTGAACCAGATGCAACTCCATTCCAGGAGGG
ACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCTATCTCAAGCCTGCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCC
CAGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGACATCTTTGAACAGTGGGCC
CATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCCG

50

GTGCTTCAATTTTCTGAGAAAGAACTGTTCTTTAAGACTTCC（配列番号 28）

を含む核酸配列によりコードされている、請求項 55 に記載のトランスポゾン。

【請求項 57】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドが、

GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDNRNPFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTI SPDY
AYGATGHPGII PHATLVFDVELLKLEGGGGSGFGDVGALSLRGNADLAYI SLMEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRT
GSNIDCEKLRRRFSSLFHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSV
KIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGRLTFDQLDAISSLP
TSPDI
FVSYSTFPFGVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS（配
列番号 29）

10

を含むアミノ酸配列によりコードされている、請求項 44～56 のいずれか一項に記載のトランスポゾン。

【請求項 58】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドが、

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTTACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGGGGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACAC
CGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTGACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGG
AAGTGATCCGAGGATGGGAGGAAGCGGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCCAACTGACCATTAGCCCTGACTAC
GCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATCATTTCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGATGTGGAAGCTGCTGAAGCTGGA
GGGAGGAGGAGGATCCGAATTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACATCCTGA
GCATGGAACCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTGCAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGC
TCCAATATTGACTGTGAGAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTGAAGTGAAAGGGGATCTGACCGC
CAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGTCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATGGAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCTGTGATCCTGT
CCCACGGGTGCCAGGCTTCTCATCTGCAGTTCCCGGAGCAGTGACGGAACAGACGGCTGTCTGTGAGCGTGGAGAAG
ATCGTCAACATCTTCAACGGCACCTTCTTGCCCTAGTCTGGGGGAAAGCCAAAAGTGTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGG
GGAACAGAAAGATCACGGCTTCGAGGTGGCCAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCTGAACCAGATG
CAACTCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCTATCTCAAGCCTGCCCCACTCCTAGTGACATTTTC
GTGCTTTACAGTACCTTCCAGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGA
CATCTTTGAACAGTGGGCCCATTTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCA
TCTACAAACAGATGCCCGGTGCTTCAATTTTCTGAGAAAGAAAGTGTCTTTAAGACTTCC（配列番号 30）

20

を含む核酸配列によりコードされている、請求項 57 に記載のトランスポゾン。

30

【請求項 59】

前記トランスポゾンが少なくとも 1 つの自己切断ペプチドを含む、請求項 38～58 のいずれか一項に記載のトランスポゾン。

【請求項 60】

前記トランスポゾンが少なくとも 1 つの自己切断ペプチドを含み、自己切断ペプチドが前記 CAR と前記選択遺伝子の間に位置する、請求項 39～58 のいずれか一項に記載のトランスポゾン。

【請求項 61】

前記トランスポゾンが少なくとも 1 つの自己切断ペプチドを含み、自己切断ペプチドが前記 CAR と前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの間に位置する、請求項 44～60 のいずれか一項に記載のトランスポゾン。

40

【請求項 62】

前記トランスポゾンが少なくとも 2 つの自己切断ペプチドを含み、第 1 の自己切断ペプチドが前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの上流に位置し、第 2 の自己切断ペプチドが前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの下流に位置する、請求項 44～61 のいずれか一項に記載のトランスポゾン。

【請求項 63】

前記トランスポゾンが少なくとも 1 つの自己切断ペプチドを含み、第 1 の自己切断ペプチドが前記 CAR の上流に位置し、第 2 の自己切断ペプチドが前記 CAR の下流に位置する、請求項 38～62 のいずれか一項に記載のトランスポゾン。

50

【請求項 6 4】

前記少なくとも 1 つの自己切断ペプチドが、T 2 A ペプチド、G S G - T 2 A ペプチド、E 2 A ペプチド、G S G - E 2 A ペプチド、F 2 A ペプチド、G S G - F 2 A ペプチド、P 2 A ペプチド、または G S G - P 2 A ペプチドを含む、請求項 5 9 ~ 6 3 のいずれか一項に記載のトランスポゾン。

【請求項 6 5】

前記 T 2 A ペプチドが、E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号 3 1) を含むアミノ酸配列を含む、請求項 6 4 に記載のトランスポゾン。

【請求項 6 6】

前記 G S G - T 2 A ペプチドが、G S G E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号 3 2) を含むアミノ酸配列を含む、請求項 6 4 に記載のトランスポゾン。

10

【請求項 6 7】

前記 E 2 A ペプチドが、Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 4) を含むアミノ酸配列を含む、請求項 6 4 に記載のトランスポゾン。

【請求項 6 8】

前記 G S G - E 2 A ペプチドが、G S G Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 5) を含むアミノ酸配列を含む、請求項 6 4 に記載のトランスポゾン。

【請求項 6 9】

前記 F 2 A ペプチドが、V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 6) を含むアミノ酸配列を含む、請求項 6 4 に記載のトランスポゾン。

20

【請求項 7 0】

前記 G S G - F 2 A ペプチドが、G S G V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 7) を含むアミノ酸配列を含む、請求項 6 4 に記載のトランスポゾン。

【請求項 7 1】

前記 P 2 A ペプチドが、A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号 3 8) を含むアミノ酸配列を含む、請求項 6 4 に記載のトランスポゾン。

【請求項 7 2】

前記 G S G - P 2 A ペプチドが、G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号 3 9) を含むアミノ酸配列を含む、請求項 6 4 に記載のトランスポゾン。

【請求項 7 3】

前記トランスポゾンが p i g g y B a c トランスポゾンである、請求項 3 8 ~ 7 2 のいずれか一項に記載のトランスポゾン。

30

【請求項 7 4】

請求項 3 8 ~ 7 3 のいずれか一項に記載のトランスポゾンを含む組成物。

【請求項 7 5】

トランスポザラーゼ酵素をコードする配列を含むプラスミドをさらに含む、請求項 7 4 に記載の組成物。

【請求項 7 6】

トランスポザラーゼ酵素をコードする前記配列が m R N A 配列である、請求項 7 5 に記載の組成物。

40

【請求項 7 7】

前記トランスポザラーゼが p i g g y B a c トランスポザラーゼである、請求項 7 4 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7 8】

前記 p i g g y B a c トランスポザラーゼが、配列番号 1 2 を含むアミノ酸配列を含む、請求項 7 7 に記載の組成物。

【請求項 7 9】

前記 p i g g y B a c トランスポザラーゼが、高活性改変体であり、前記高活性改変体が、配列番号 1 2 の 3 0、1 6 5、2 8 2、および 5 3 8 位の 1 つまたは複数にアミノ酸置換を含む、請求項 7 7 または 7 8 に記載の組成物。

50

【請求項 80】

配列番号 12 の 30 位における前記アミノ酸置換が、イソロイシン (I) からバリン (V) への置換 (I 30 V) である、請求項 79 に記載の組成物。

【請求項 81】

配列番号 12 の 165 位における前記アミノ酸置換が、グリシン (G) からセリン (S) への置換 (G 165 S) である、請求項 79 に記載の組成物。

【請求項 82】

配列番号 12 の 282 位における前記アミノ酸置換が、メチオニン (M) からバリン (V) への置換 (M 282 V) である、請求項 79 に記載の組成物。

【請求項 83】

配列番号 12 の 538 位における前記アミノ酸置換が、アスパラギン (N) からリシン (K) への置換 (N 538 K) である、請求項 79 に記載の組成物。

【請求項 84】

前記トランスポザーゼが Super piggy Bac (sPBo) トランスポザーゼである、請求項 77～83 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 85】

前記 Super piggy Bac (sPBo) トランスポザーゼが、配列番号 2 を含むアミノ酸配列を含む、請求項 84 に記載の組成物。

【請求項 86】

請求項 1～36 のいずれか一項に記載の CAR を含むベクター。

【請求項 87】

ウイルスベクターである、請求項 86 に記載のベクター。

【請求項 88】

前記ウイルスベクターがレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスもしくはそれらの任意の組み合わせから単離されたか、またはそれらに由来する配列を含む、請求項 87 に記載のベクター。

【請求項 89】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスから単離されたか、またはそれに由来する配列を含む、請求項 87 または 88 に記載のベクター。

【請求項 90】

前記ウイルスベクターが組換えベクターである、請求項 87～89 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 91】

ナノ粒子ベクターである、請求項 86 に記載のベクター。

【請求項 92】

前記ナノ粒子ベクターが、核酸、アミノ酸、ポリマー、ミセル、脂質、有機分子、無機分子またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項 91 に記載のベクター。

【請求項 93】

選択遺伝子をさらに含む、請求項 86～92 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 94】

前記選択遺伝子が、細胞生存度および生存に不可欠な遺伝子産物をコードする、請求項 93 に記載のベクター。

【請求項 95】

前記選択遺伝子が、選択的細胞培養条件によってチャレンジされたときの細胞生存度および生存に不可欠な遺伝子産物をコードする、請求項 93 に記載のベクター。

【請求項 96】

前記選択的細胞培養条件が、細胞生存度または生存に有害な化合物を含み、前記遺伝子産物が前記化合物に対する耐性を付与する、請求項 95 に記載のベクター。

【請求項 97】

前記選択遺伝子が、neo、DHFR (ジヒドロ葉酸レダクターゼ)、TYMS (チミ

10

20

30

40

50

ジル酸シンテターゼ)、MGMT (O (6) -メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ)、多剤耐性遺伝子(MDR1)、ALDH1 (アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリー、メンバーA1)、FRANCF、RAD51C (RAD51 パラログC)、GCS (グルコシルセラミドシンテターゼ)、NKX2.2 (NK2 ホメオボックス2) またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項93~96のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項98】

- (a) リガンド結合領域と、
- (b) リンカーと、
- (c) 切断型カスパーゼ9ポリペプチドと

を含む誘導性カスパーゼ9ポリペプチドであって、非ヒト配列を含まない誘導性カスパーゼ9ポリペプチドを含む、請求項86~97のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項99】

前記非ヒト配列が、制限部位である、請求項98に記載のベクター。

【請求項100】

前記誘導性カスパーゼ9ポリペプチドの前記リガンド結合領域が、FK506結合タンパク質12 (FKBP12) ポリペプチドを含む、請求項98または99に記載のベクター。

【請求項101】

前記FK506結合タンパク質12 (FKBP12) ポリペプチドのアミノ酸配列が、前記配列の36位に修飾を含む、請求項100に記載のベクター。

【請求項102】

前記修飾が、36位におけるフェニルアラニン (F) からバリン (V) への置換 (F36V) である、請求項101に記載のベクター。

【請求項103】

前記FKBP12ポリペプチドが、
GVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDY
AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE (配列番号23)
を含むアミノ酸配列によりコードされている、請求項100~102のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項104】

前記FKBP12ポリペプチドが、
GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTACACAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGGGGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACAC
CGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTGGACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGG
AAGTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCCAAACTGACCATTAGCCCTGACTAC
GCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATCATTTCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGATGTGGAAGCTGCTGAAGCTGGA
G (配列番号24)
を含む核酸配列によりコードされている、請求項103に記載のベクター。

【請求項105】

誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのリンカー領域が、GGGGS (配列番号25) を含むアミノ酸によりコードされている、請求項98~104のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項106】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの前記リンカー領域が、GGAGGAGGAGGATCC (配列番号26) を含む核酸配列によりコードされている、請求項105に記載のベクター。

【請求項107】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの前記切断型カスパーゼ9ポリペプチドが、配列の87位にアルギニン (R) を含まないアミノ酸配列によりコードされている、請求項98~106のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 108】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの前記切断型カスパーゼ9ポリペプチドが、配列の282位にアラニン（A）を含まないアミノ酸配列によりコードされている、請求項98～107のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 109】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの前記切断型カスパーゼ9ポリペプチドが、

GFGDVGALSLRGNADLAYISLMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSSLHFMVEVKGDLTAKKMVL
ALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDH
GFEVASTPEDESPGSNPEPDATPFQEGRLTFDQLDAISSLPSPDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQW
AHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKMPGCNFLRKKLFFKTS（配列番号27）

を含むアミノ酸によりコードされている、請求項98～108のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 110】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの前記切断型カスパーゼ9ポリペプチドが、

TTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACATCCTGAGCATGGAACCCCTGCGGCCA
CTGTCTGATCATTAAACATGTGAACTTCTGCAGAGAAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATATTGACTGTGAGA
AGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTGAAAGGGGATCTGACCGCCAAGAAAATGGTGCTGGCC
CTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATGGAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCTGATCCTGTCCACGGGTGCCAGGCTTC
TCATCTGCAGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCTCTGTCAGCGTGGAGAAGATCGTCAACATCTTCAACG
GCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGGGAAAAGCCAAAAGTGTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCACGGC
TTCGAGGTGGCCAGCACCCAGCCCTGAGGACGAATCACCGAGGAGCAACCCCTGAACCAGATGCAACTCCATTCCAGGAGGG
ACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCTATCTCAAGCCTGCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCC
CAGGCTTTTGCTCATGGCGGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGACATCTTTGAACAGTGGGCC
CATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCCG
GTGCTTCAATTTTCTGAGAAAAGAACTGTTCTTTAAGACTTCC（配列番号28）

を含む核酸配列によりコードされている、請求項109に記載のベクター。

【請求項 111】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドが、

GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDNRNPKFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVQRAKLTI
SPDYAYGATGHPGIIIPPHATLVFDVELLKLEGGGGSGFGDVGALSLRGNADLAYISLMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRT
GSNIDCEKLRRRFSSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVE
KIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTPEDESPGSNPEPDATPFQEGRLTFDQLDAISSLPSPDI
FVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKMPGCNFLRKKLFFKTS（配列
番号29）

を含むアミノ酸配列によりコードされている、請求項98～110のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 112】

前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドが、

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTACCCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGGGGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACAC
CGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTGGACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGG
AAGTGATCCGAGGATGGGAGGAAGCGTGGCACAGATGTACGTGCGCCAGCGGCCAAACTGACCATTAGCCCTGACTAC
GCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATCATTTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGATGTGGAAGTCTGTAAGCTGGA
GGGAGGAGGAGGATCCGAATTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACATCCTGA
GCATGGAACCCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACATGTGAACTTCTGCAGAGAAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGC
TCCAATATTGACTGTGAGAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTGAAAGGGGATCTGACCGC
CAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATGGAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCTGATCCTGT
CCCACGGGTGCCAGGCTTCTCATCTGCAGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCTCTGTCAGCGTGGAGAAG
ATCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGGGAAAAGCCAAAAGTGTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGG

GGAACAGAAAAGATCACGGCTTCGAGGTGGCCAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCTGAACCAGATG
CAACTCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCTATCTCAAGCCTGCCCACTCCTAGTGACATTTTC
GTGTCTTACAGTACCTTCCCAGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGA
CATCTTTGAACAGTGGGCCCCATTGAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCA
TCTACAAACAGATGCCCCGGGTGCTTCAATTTTCTGAGAAAAGAACTGTTCTTTAAGACTTCC（配列番号 30）

を含む核酸配列によりコードされている、請求項 111 に記載のベクター。

【請求項 113】

少なくとも 1 つの自己切断ペプチドを含む、請求項 86 ～ 112 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 114】

前記ベクターが少なくとも 1 つの自己切断ペプチドを含み、自己切断ペプチドが前記 C A R と選択遺伝子の間に位置する、請求項 86 ～ 112 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 115】

前記トランスポゾンが少なくとも 1 つの自己切断ペプチドを含み、自己切断ペプチドが前記 C A R と前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの間に位置する、請求項 98 ～ 114 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 116】

前記トランスポゾンが少なくとも 2 つの自己切断ペプチドを含み、第 1 の自己切断ペプチドが前記誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの上流に位置し、第 2 の自己切断ペプチドが前記アポトーシス誘導性ポリペプチドの下流に位置する、請求項 98 ～ 115 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 117】

前記ベクターが少なくとも 1 つの自己切断ペプチドを含み、第 1 の自己切断ペプチドが前記 C A R の上流に位置し、第 2 の自己切断ペプチドが前記 C A R の下流に位置する、請求項 86 ～ 116 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 118】

前記少なくとも 1 つの自己切断ペプチドが、T 2 A ペプチド、G S G - T 2 A ペプチド、E 2 A ペプチド、G S G - E 2 A ペプチド、F 2 A ペプチド、G S G - F 2 A ペプチド、P 2 A ペプチド、または G S G - P 2 A ペプチドを含む、請求項 113 ～ 117 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 119】

前記 T 2 A ペプチドが、E G R G S L L T C G D V E E N P G P（配列番号 31）を含むアミノ酸配列を含む、請求項 118 に記載のベクター。

【請求項 120】

前記 G S G - T 2 A ペプチドが、G S G E G R G S L L T C G D V E E N P G P（配列番号 32）を含むアミノ酸配列を含む、請求項 118 に記載のベクター。

【請求項 121】

前記 E 2 A ペプチドが、Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P（配列番号 34）を含むアミノ酸配列を含む、請求項 118 に記載のベクター。

【請求項 122】

前記 G S G - E 2 A ペプチドが、G S G Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P（配列番号 35）を含むアミノ酸配列を含む、請求項 118 に記載のベクター。

【請求項 123】

前記 F 2 A ペプチドが、V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P（配列番号 36）を含むアミノ酸配列を含む、請求項 118 に記載のベクター。

【請求項 124】

前記 G S G - F 2 A ペプチドが、G S G V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P（配列番号 37）を含むアミノ酸配列を含む、請求項 118 に記載のベクター。

【請求項 125】

前記 P 2 A ペプチドが、A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P（配列番号 38）を含むアミノ酸配列を含む、請求項 118 に記載のベクター。

【請求項 126】

前記 G S G - P 2 A ペプチドが、G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P（配列番号 39）を含むアミノ酸配列を含む、請求項 118 に記載のベクター。

【請求項 127】

請求項 86～126 のいずれか一項に記載のベクターを含む組成物。

【請求項 128】

請求項 1～36 のいずれか一項に記載の C A R を含む細胞。

【請求項 129】

請求項 38～85 のいずれか一項に記載のトランスポゾンまたはトランスポザーゼを含む細胞。

【請求項 130】

請求項 86～126 のいずれか一項に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 131】

細胞表面に前記 C A R を発現する、請求項 128～130 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 132】

免疫細胞である、請求項 128～131 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 133】

前記免疫細胞が、T 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラー（NK）様細胞、造血前駆細胞、末梢血（PB）由来 T 細胞または臍帯血（UCB）由来 T 細胞である、請求項 132 に記載の細胞。

【請求項 134】

前記免疫細胞が T 細胞である、請求項 132 に記載の細胞。

【請求項 135】

人工抗原提示細胞である、請求項 128～131 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 136】

腫瘍細胞である、請求項 128～131 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 137】

自己のものである、請求項 118～136 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 138】

同種異系のものである、請求項 118～136 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 139】

請求項 128～138 のいずれか一項に記載の細胞を含む組成物。

【請求項 140】

細胞の表面にキメラ抗原受容体（C A R）を発現させるための方法であって、

（a）細胞集団を得るステップ、

（b）前記細胞集団を、請求項 1～36 のいずれか一項に記載の C A R または前記 C A R をコードする配列を含む組成物に、前記細胞集団内の少なくとも 1 つの細胞の細胞膜を横切って前記 C A R を移行させるのに十分な条件下で接触させることによって、修飾された細胞集団を生成するステップ、

（c）修飾された前記細胞集団を、前記 C A R の組込みに好適な条件下で、培養するステップ、

（d）細胞表面に前記 C A R を発現する修飾された前記細胞集団の少なくとも 1 つの細胞を増殖および／または選択するステップ、

を含む、方法。

【請求項 141】

前記細胞集団が白血球を含む、請求項 140 に記載の方法。

【請求項 142】

10

20

30

40

50

前記細胞集団が C D 4 + および C D 8 + 白血球を最適化された比で含む、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

C D 4 + 白血球の C D 8 + 白血球に対する前記最適化された比が、i n v i v o には天然に存在しない、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

トランスポゾンまたはベクターが、前記 C A R または前記 C A R をコードする前記配列を含む、請求項 1 4 0 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

請求項 3 8 から 7 3 のいずれか一項に記載のトランスポゾンが前記 C A R または前記 C A R をコードする前記配列を含む、請求項 1 4 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 4 6】

前記トランスポゾンが p i g g y B a c トランスポゾンを含む、請求項 1 4 4 または 1 4 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

トランスポザーゼ酵素をコードする配列を含むプラスミドを含む組成物をさらに含む、請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

トランスポザーゼ酵素をコードする前記配列が m R N A 配列である、請求項 1 4 7 に記載の方法。

20

【請求項 1 4 9】

前記トランスポザーゼが p i g g y B a c トランスポザーゼである、請求項 1 4 7 または 1 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記 p i g g y B a c トランスポザーゼが、配列番号 1 2 を含むアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記 p i g g y B a c トランスポザーゼが、高活性改変体であり、前記高活性改変体が、配列番号 1 2 の 3 0、1 6 5、2 8 2、および 5 3 8 位の 1 つまたは複数にアミノ酸置換を含む、請求項 1 4 9 または 1 5 0 に記載の方法。

30

【請求項 1 5 2】

配列番号 1 2 の 3 0 位における前記アミノ酸置換が、イソロイシン (I) からバリン (V) への置換 (I 3 0 V) である、請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

配列番号 1 2 の 1 6 5 位における前記アミノ酸置換が、グリシン (G) からセリン (S) への置換 (G 1 6 5 S) である、請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

配列番号 1 2 の 2 8 2 位における前記アミノ酸置換が、メチオニン (M) からバリン (V) への置換 (M 2 8 2 V) である、請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

配列番号 1 2 の 5 3 8 位における前記アミノ酸置換が、アスパラギン (N) からリシン (K) への置換 (N 5 3 8 K) である、請求項 1 5 1 に記載の方法。

40

【請求項 1 5 6】

前記トランスポザーゼが S u p e r p i g g y B a c (s P B o) トランスポザーゼである、請求項 1 4 9 ~ 1 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

前記 S u p e r p i g g y B a c (s P B o) トランスポザーゼが、配列番号 2 を含むアミノ酸配列を含む、請求項 1 5 6 に記載の方法。

【請求項 1 5 8】

請求項 7 6 ~ 1 1 6 のいずれか一項に記載のベクターが前記 C A R または前記 C A R を

50

コードする前記配列を含む、請求項 140 に記載の方法。

【請求項 159】

前記細胞集団内の少なくとも 1 つの細胞の細胞膜を横切って前記 CAR をコードする前記配列を移行させるのに十分な条件がヌクレオフェクションを含む、請求項 140、144、145、または 158 に記載の方法。

【請求項 160】

(b) の前記細胞集団内の少なくとも 1 つの細胞の細胞膜を横切って前記 CAR をコードする前記配列を移行させるのに十分な条件が、指定電圧での 1 回または複数回の電気パルスの印加、緩衝液、および 1 つまたは複数のさらなる因子のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 140～158 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 161】

前記緩衝液が、PBS、HBSS、OptiMEM、BTXpress、Amaxa Nucleofector、ヒト T 細胞ヌクレオフェクション緩衝液またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項 160 に記載の方法。

【請求項 162】

前記 1 つまたは複数のさらなる因子が、

(a) 組換えヒトサイトカイン、ケモカイン、インターロイキンまたはこれらの任意の組み合わせ、

(b) 塩、無機物、代謝物またはこれらの任意の組み合わせ、

(c) 細胞培地、

20

(d) 細胞の DNA 感知、代謝、分化、シグナル伝達、1 つもしくは複数のアポトーシス経路またはこれらの組み合わせの阻害剤、および

(e) 1 つまたは複数の核酸を修飾または安定化する試薬を含む、請求項 160 または 161 に記載の方法。

【請求項 163】

前記組換えヒトサイトカイン、前記ケモカイン、前記インターロイキンまたはこれらの任意の組み合わせが、IL2、IL7、IL12、IL15、IL21、IL1、IL3、IL4、IL5、IL6、IL8、CXCL8、IL9、IL10、IL11、IL13、IL14、IL16、IL17、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL35、IL36、GM-CSF、IFN-ガンマ、IL-1 アルファ / IL-1 F1、IL-1 ベータ / IL-1 F2、IL-12 p70、IL-12 / IL-35 p35、IL-13、IL-17 / IL-17A、IL-17A / F ヘテロ二量体、IL-17F、IL-18 / IL-1 F4、IL-23、IL-24、IL-32、IL-32 ベータ、IL-32 ガンマ、IL-33、LAP (TGF-ベータ 1)、リンホトキシン-アルファ / TNF-ベータ、TGF-ベータ、TNF-アルファ、TRANSCIE / TNFSF11 / RANK L またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項 162 に記載の方法。

30

【請求項 164】

前記塩、前記無機物、前記代謝物またはこれらの任意の組み合わせが、HEPES、ニコチンアミド、ヘパリン、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、MEM 非必須アミノ酸溶液、アスコルビン酸、ヌクレオシド、FBS / FCS、ヒト血清、代用血清、抗生物質、pH 調節剤、アール塩、2-メルカプトエタノール、ヒトトランスフェリン、組換えヒトインスリン、ヒト血清アルブミン、Nucleofector PLUS Supplement、KCL、MgCl2、Na2HPO4、NAH2PO4、ラクトビオン酸ナトリウム、マンニトール、コハク酸ナトリウム、塩化ナトリウム、CINa、グルコース、Ca(NO3)2、Tris / HCl、K2HPO4、KH2PO4、ポリエチレンイミン、ポリエチレングリコール、ポロクサマー 188、ポロクサマー 181、ポロクサマー 407、ポリビニルピロリドン、Pop313、クラウン-5、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項 162 に記載の方法。

40

50

【請求項165】

前記細胞培地が、PBS、HBSS、OptiMEM、DMEM、RPMI1640、AIM-V、X-VIVO 15、CellGro DC培地、CTS Optimizer T Cell Expansion SFM、TexMACS培地、PRIME-XV T Cell Expansion培地、ImmunoCult-XF T Cell Expansion培地またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項162に記載の方法。

【請求項166】

細胞のDNA感知、代謝、分化、シグナル伝達、1つもしくは複数のアポトーシス経路、またはこれらの組み合わせの前記阻害剤が、TLR9、MyD88、IRAK、TRAF6、TRAF3、IRF-7、NF-KB、1型インターフェロン、炎症促進性サイトカイン、cGAS、STING、Sec5、TBK1、IRF-3、RNA pol I、RIG-1、IPS-1、FADD、RIP1、TRAF3、AIM2、ASC、カスパーゼ1、Pro-IL1B、PI3K、Akt、Wnt3A、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3β (GSK-3β) の阻害剤、TWS119、バフィロマイシン、クロロキン、キナクリン、AC-YVAD-CMK、Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMKまたはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項162に記載の方法。

【請求項167】

1つまたは複数の核酸を修飾または安定化する前記試薬が、pH調整剤、DNA結合タンパク質、脂質、リン脂質、CaPO4、NLS配列を有するまたは有さない正味中性電荷DNA結合ペプチド、TREX1酵素、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項162に記載の方法。

【請求項168】

前記CARまたは前記CARをコードする前記配列の組込みに好適な条件が、緩衝液および1つまたは複数のさらなる因子のうちの少なくとも1つを含む、請求項140～158のいずれか一項に記載の方法。

【請求項169】

前記緩衝液が、PBS、HBSS、OptiMEM、BTXpress、Amaxa Nucleofector、ヒトT細胞ヌクレオフェクション緩衝液、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項168に記載の方法。

【請求項170】

前記1つまたは複数のさらなる因子が、
 (a) 組換えヒトサイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、またはこれらの任意の組み合わせ、
 (b) 塩、無機物、代謝物、またはこれらの任意の組み合わせ、
 (c) 細胞培地、
 (d) 細胞のDNA感知、代謝、分化、シグナル伝達、1つまたは複数のアポトーシス経路、またはこれらの組み合わせの阻害剤、および
 (e) 1つまたは複数の核酸を修飾または安定化する試薬を含む、請求項168または169に記載の方法。

【請求項171】

前記組換えヒトサイトカイン、前記ケモカイン、前記インターロイキンまたはこれらの任意の組み合わせが、IL2、IL7、IL12、IL15、IL21、IL1、IL3、IL4、IL5、IL6、IL8、CXCL8、IL9、IL10、IL11、IL13、IL14、IL16、IL17、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL35、IL36、GM-CSF、IFN-ガンマ、IL-1アルファ/IL-1F1、IL-1ベータ/IL-1F2、IL-12 p70、IL-12/IL-35 p35、IL-13、IL-17/IL-17A、IL-17A/Fヘテロ二量体、IL-17F、IL-18/IL-1F4、IL-23、IL-24、IL-32

10

20

30

40

50

、IL-32ベータ、IL-32ガンマ、IL-33、LAP（TGF-β1）、リンホトキシン-α/TNF-β、TGF-β、TNF-α、TNF-α/TNFSF11/RANKLまたはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項170に記載の方法。

【請求項172】

前記塩、前記無機物、前記代謝物またはこれらの任意の組み合わせが、HEPES、ニコチンアミド、ヘパリン、ビルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、MEM非必須アミノ酸溶液、アスコルビン酸、ヌクレオシド、FBS/FCS、ヒト血清、代用血清、抗生物質、pH調節剤、アール塩、2-メルカプトエタノール、ヒトトランスフェリン、組換えヒトインスリン、ヒト血清アルブミン、Nucleofector PLUS Supplement、KCL、MgCl₂、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、ラクトビオン酸ナトリウム、マンニトール、コハク酸ナトリウム、塩化ナトリウム、CINa、グルコース、Ca(NO₃)₂、Tris/HCl、K₂HPO₄、KH₂PO₄、ポリエチレンイミン、ポリエチレングリコール、ポロクサマー188、ポロクサマー181、ポロクサマー407、ポリビニルピロリドン、Pop313、クラウン-5、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項170に記載の方法。

10

【請求項173】

前記細胞培地が、PBS、HBSS、OptiMEM、DMEM、RPMI1640、AIM-V、X-VIVO15、CellGro DC培地、CTS Optimizer T Cell Expansion SFM、TexMACS培地、PRIME-XV T Cell Expansion培地、ImmunoCult-XF T Cell Expansion培地またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項170に記載の方法。

20

【請求項174】

細胞のDNA感知、代謝、分化、シグナル伝達、1つもしくは複数のアポトーシス経路、またはこれらの組み合わせの前記阻害剤が、TLR9、MyD88、IRAK、TRAF6、TRAF3、IRF-7、NF-κB、1型インターフェロン、炎症促進性サイトカイン、cGAS、STING、Sec5、TBK1、IRF-3、RNA pol I、RIG-1、IPS-1、FADD、RIP1、TRAF3、AIM2、ASC、カスパーゼ1、Pro-IL1β、PI3K、Akt、Wnt3A、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3β（GSK-3β）の阻害剤、TWS119、バフィロマイシン、クロロキン、キナクリン、AC-YVAD-CMK、Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMKまたはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項170に記載の方法。

30

【請求項175】

1つまたは複数の核酸を修飾または安定化する前記試薬が、pH調整剤、DNA結合タンパク質、脂質、リン脂質、CaPO₄、NLS配列を有するまたは有さない正味中性電荷DNA結合ペプチド、TREX1酵素、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項170に記載の方法。

【請求項176】

(d)の前記増殖および前記選択を逐次的に行う、請求項140～175のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項177】

前記増殖を選択の前に行う、請求項176に記載の方法。

【請求項178】

前記増殖を選択の後に行う、請求項176に記載の方法。

【請求項179】

さらなる選択を増殖の後に行う、請求項178に記載の方法。

【請求項180】

(d)の前記増殖および前記選択を同時に行う、請求項140～175のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 181】

前記増殖が、修飾された前記細胞集団の少なくとも1つの細胞を抗原と接触させて、前記CARにより前記少なくとも1つの細胞を刺激するステップを含む、請求項140～180のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 182】

前記抗原が支持体の表面に提示される、請求項181に記載の方法。

【請求項 183】

前記支持体がビーズまたは複数のビーズである、請求項182に記載の方法。

【請求項 184】

前記ビーズまたは複数のビーズが、増殖の後に修飾された前記細胞集団から分離される、請求項183に記載の方法。 10

【請求項 185】

前記抗原が細胞の表面に提示される、請求項181に記載の方法。

【請求項 186】

前記抗原が人工抗原提示細胞の表面に提示される、請求項185に記載の方法。

【請求項 187】

前記トランスポゾンまたは前記ベクターが選択遺伝子を含み、前記選択ステップが、修飾された前記細胞集団の少なくとも1つの細胞を、前記選択遺伝子が耐性を付与する化合物と接触させることによって、前記選択遺伝子を発現する細胞を、前記選択を生き抜くものとして同定し、前記選択遺伝子を発現することができない細胞を、前記選択ステップを生き抜くことができないものとして同定するステップを含む、請求項140～186のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 188】

前記増殖ステップおよび前記選択ステップが、端点を含む10～14日の期間にわたり進行する、請求項140～187のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 189】

請求項140～188のいずれか一項に記載の増殖および選択された細胞集団を含む組成物。

【請求項 190】

がんの処置を必要とする被験体におけるがんを処置する方法であって、前記被験体に請求項37、74～85、127、139または189のいずれか一項に記載の組成物を投与するステップを含み、CARが腫瘍細胞上の抗原に特異的に結合する、方法。 30

【請求項 191】

前記腫瘍細胞が悪性腫瘍細胞である、請求項190に記載の方法。

【請求項 192】

前記被験体に請求項139または185の組成物を投与するステップを含み、前記細胞または細胞集団が自己のものである、請求項190または191に記載の方法。

【請求項 193】

前記被験体に請求項139または185に記載の組成物を投与するステップを含み、前記細胞または細胞集団が同種異系のものである、請求項190または191に記載の方法。 40

【請求項 194】

自己免疫状態の処置を必要とする被験体の自己免疫状態を処置する方法であって、前記被験体に請求項37、74～85、127、139または189のいずれか一項に記載の組成物を投与するステップを含み、CARが前記被験体の自己免疫細胞上の抗原に特異的に結合する、方法。

【請求項 195】

前記自己免疫細胞が、前記被験体の標的細胞上の自己抗原に特異的に結合するリンパ球である、請求項194に記載の方法。

【請求項 196】

前記自己免疫細胞がBリンパ球である、請求項194または195に記載の方法。

【請求項197】

前記自己免疫細胞がTリンパ球である、請求項194または195に記載の方法。

【請求項198】

前記被験体に請求項139または185に記載の組成物を投与するステップを含み、前記細胞または細胞集団が自己のものである、請求項194～197のいずれか一項に記載の方法。

【請求項199】

前記被験体に請求項139または185に記載の組成物を投与するステップを含み、前記細胞または細胞集団が同種異系のものである、請求項194～197のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項200】

感染の処置または予防を必要とする被験体における感染を処置または予防する方法であって、前記被験体に請求項37、74～85、127、139または189のいずれか一項に記載の組成物を投与するステップを含み、CARが、感染因子を含む細胞、感染因子に伝染した細胞、または感染因子に曝露された細胞上の抗原に特異的に結合する、方法。

【請求項201】

前記感染因子が、細菌、ウイルス、酵母または微生物である、請求項200に記載の方法。

【請求項202】

前記感染因子が、感染、免疫不全状態、炎症状態および増殖性障害のうちの1つまたは複数を誘導しうる、請求項200または201に記載の方法。

20

【請求項203】

前記感染が、結核、小頭症、神経変性またはマラリアを引き起こす、請求項202に記載の方法。

【請求項204】

前記感染が、前記被験体の胎児で小頭症を引き起こす、請求項202または203に記載の方法。

【請求項205】

前記感染因子がウイルスであり、前記ウイルスがジカウイルスである、請求項204に記載の方法。

30

【請求項206】

前記免疫不全状態が後天性免疫不全症候群(AIDS)である、請求項202に記載の方法。

【請求項207】

前記増殖性障害ががんである、請求項202に記載の方法。

【請求項208】

前記がんが子宮頸がんであり、前記感染因子がヒトパピローマウイルス(HPV)である、請求項207に記載の方法。

【請求項209】

前記被験体に請求項139または185に記載の組成物を投与するステップを含み、前記細胞または細胞集団が自己のものである、請求項200～208のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項210】

前記被験体に請求項139または185に記載の組成物を投与するステップを含み、前記細胞または細胞集団が同種異系のものである、請求項200～208のいずれか一項に記載の方法。

【請求項211】

肥満細胞疾患の処置を必要とする被験体における肥満細胞疾患を処置する方法であって、前記被験体に請求項37、74～85、127、139または189のいずれか一項に

50

記載の組成物を投与するステップを含み、C A Rが肥満細胞上の抗原に特異的に結合する、方法。

【請求項 2 1 2】

前記肥満細胞疾患が肥満細胞の過剰な増殖と関連する障害である、請求項 2 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 1 3】

前記肥満細胞疾患が肥満細胞症である、請求項 2 1 2 に記載の方法。

【請求項 2 1 4】

前記肥満細胞疾患が肥満細胞の異常な活性と関連する障害である、請求項 2 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1 5】

前記肥満細胞疾患が肥満細胞活性化症候群（M C A S）、アレルギー疾患、喘息または炎症性疾患である、請求項 2 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 1 6】

前記被験体に請求項 1 3 9 または 1 8 5 に記載の組成物を投与するステップを含み、前記細胞または細胞集団が自己のものである、請求項 2 1 1 ～ 2 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1 7】

前記被験体に請求項 1 3 9 または 1 8 5 に記載の組成物を投与するステップを含み、前記細胞または細胞集団が同種異系のものである、請求項 2 1 1 ～ 2 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1 8】

変性疾患の処置を必要とする被験体における変性疾患を処置する方法であって、前記被験体に請求項 3 7、7 4 ～ 8 5、1 2 7、1 3 9 または 1 8 9 のいずれか一項に記載の組成物を投与するステップを含み、C A Rが有害な細胞または老化細胞上の抗原に特異的に結合する、方法。

【請求項 2 1 9】

前記変性疾患が、神経変性障害、代謝障害、血管障害または老化である、請求項 2 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2 0】

前記変性疾患が神経変性障害であり、前記有害な細胞または前記老化細胞が幹細胞、免疫細胞、ニューロン、グリアまたはミクログリアである、請求項 2 1 8 または 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 1】

前記変性疾患が代謝障害であり、前記有害な細胞または前記老化細胞が幹細胞、体細胞、ニューロン、グリアまたはミクログリアである、請求項 2 1 8 または 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 2】

前記変性疾患が血管障害であり、前記有害な細胞または前記老化細胞が幹細胞、体細胞、免疫細胞、内皮細胞、ニューロン、グリアまたはミクログリアである、請求項 2 1 8 または 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

前記変性疾患が老化であり、前記有害な細胞または前記老化細胞が卵母細胞、精子、幹細胞、体細胞、免疫細胞、内皮細胞、ニューロン、グリアまたはミクログリアである、請求項 2 1 8 または 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 4】

前記被験体に請求項 1 3 9 または 1 8 5 に記載の組成物を投与するステップを含み、前記細胞または細胞集団が自己のものである、請求項 2 1 8 ～ 2 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2 5】

10

20

30

40

50

前記被験体に請求項 1 3 9 または 1 8 5 に記載の組成物を投与するステップを含み、前記細胞または細胞集団が同種異系のものである、請求項 2 1 8 ～ 2 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2 6】

細胞療法の改変を必要とする被験体における細胞療法を改変する方法であって、前記被験体に請求項 3 8 ～ 7 3 のいずれか一項に記載のトランスポゾンを含む細胞を含む組成物を投与するステップを含み、アポトーシスが、前記細胞を誘導剤と接触させることによって前記細胞に選択的に誘導されうる、方法。

【請求項 2 2 7】

細胞療法の改変を必要とする被験体における細胞療法を改変する方法であって、前記被験体に請求項 8 6 ～ 1 2 6 のいずれか一項に記載のベクターを含む細胞を含む組成物を投与するステップを含み、アポトーシスが、前記細胞を誘導剤と接触させることによって前記細胞に選択的に誘導されうる、方法。

【請求項 2 2 8】

前記細胞が自己のものである、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 2 9】

前記細胞が同種異系のものである、請求項 2 2 6 または 2 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 3 0】

前記細胞療法が養子細胞療法である、請求項 2 2 6 ～ 2 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3 1】

前記改変が、前記細胞療法の終了である、請求項 2 2 6 ～ 2 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3 2】

前記改変が、前記細胞療法で提供される細胞の一部の枯渇である、請求項 2 2 6 ～ 2 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3 3】

前記誘導剤の阻害剤を投与して、前記細胞療法の改変を阻害し、それによって前記細胞療法の機能および／または有効性を回復させるステップをさらに含む、請求項 2 2 6 ～ 2 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

この出願は、2 0 1 6 年 7 月 1 5 日に提出された仮出願 U S S N 6 2 / 3 6 2 , 7 4 6 、 2 0 1 6 年 1 0 月 6 日に提出された仮出願 U S S N 6 2 / 4 0 5 , 1 8 0 、 および 2 0 1 7 年 5 月 8 日に提出された仮出願 U S S N 6 2 / 5 0 3 , 1 2 7 (これら各々の内容は、それらの全体が参考として本明細書に援用される) の利益を特許請求される。

【0 0 0 2】

配列表の援用

2 0 1 7 年 7 月 1 3 日に作成した、サイズが 5 5 K B である「P O T H - 0 0 8 _ 0 0 1 W O _ S e q L i s t」という名のテキストファイルの内容は、それら全体が参照により本明細書に援用される。

【0 0 0 3】

本開示は分子生物学に関し、より具体的には、キメラ抗原受容体、1 つまたは複数の C A R を含有するトランスポゾン、ならびにそれを作製および使用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

従来の抗体配列またはその断片を使用せずに免疫細胞の特異性を指向させる方法に対する、当技術分野で長年認識されてきたが解決されていない必要性がある。本開示は優れた

10

20

30

40

50

キメラ抗原受容体を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、(a) 抗原認識領域を含むエクトドメイン(ectodomain)であって、抗原認識領域が少なくとも1つのCentyrinを含む、エクトドメインと、(b) 膜貫通ドメインと、(c) 少なくとも1つの共刺激ドメインを含むエンドドメイン(endodomain)とを含むキメラ抗原受容体(CAR)を提供する。本開示を通して使用されるように、Centyrinを含むCARはCARTyrinと呼ばれる。ある特定の実施形態では、抗原認識領域は2つのCentyrinを含み、二重特異性またはタンデムのCARを産生することができる。ある特定の実施形態では、抗原認識領域は3つのCentyrinを含み、三重特異性のCARを産生することができる。ある特定の実施形態では、エクトドメインは、シグナルペプチドをさらに含んでもよい。あるいは、または加えて、ある特定の実施形態では、エクトドメインは、抗原認識領域と膜貫通ドメインの間にヒンジをさらに含んでもよい。

【0006】

本開示は、(a) 抗原認識領域を含むエクトドメインであって、抗原認識領域が少なくとも1つのタンパク質足場または抗体模倣物(antibody mimetic)を含む、エクトドメインと、(b) 膜貫通ドメインと、(c) 少なくとも1つの共刺激ドメインを含むエンドドメインとを含むキメラ抗原受容体(CAR)を提供する。ある特定の実施形態では、抗原認識領域は2つの足場タンパク質または抗体模倣物を含み、二重特異性またはタンデムのCARを産生することができる。ある特定の実施形態では、抗原認識領域は3つのタンパク質足場または抗体模倣物を含み、三重特異性のCARを産生することができる。ある特定の実施形態では、エクトドメインは、シグナルペプチドをさらに含んでもよい。あるいは、または加えて、ある特定の実施形態では、エクトドメインは、抗原認識領域と膜貫通ドメインの間にヒンジをさらに含んでもよい。

【0007】

本開示のCARのある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、ヒトCD2、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD8 α 、CD19、CD28、4-1BBまたはGM-CSFRシグナルペプチドをコードする配列を含んでもよい。本開示のCARのある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、ヒトCD8 α シグナルペプチドをコードする配列を含んでもよい。ヒトCD8 α シグナルペプチドは、MALPVTALLPLALLLHAAARP(配列番号3)を含むアミノ酸配列を含んでもよい。ヒトCD8 α シグナルペプチドは、MALPVTALLPLALLLHAAARP(配列番号3)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはMALPVTALLPLALLLHAAARP(配列番号3)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。ヒトCD8 α シグナルペプチドは、atggcactgccagtcacccgccctgctgctgacctctggctctgctgctgcacgcagctagacca(配列番号45)を含む核酸配列によりコードされていてもよい。

【0008】

本開示のCARのある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、ヒトCD2、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD8 α 、CD19、CD28、4-1BBまたはGM-CSFR膜貫通ドメインをコードする配列を含んでもよい。本開示のCARのある特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、ヒトCD8 α 膜貫通ドメインをコードする配列を含んでもよい。CD8 α 膜貫通ドメインは、IYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYC(配列番号4)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYC(配列番号4)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。CD8 α 膜貫通ドメインは、atctacatttgggcaccactggc

c g g g a c c t g t g g a g t g c t g c t g c t g a g c c t g g t c a t c a c a
c t g t a c t g c (配列番号5)を含む核酸配列によりコードされていてもよい。

【0009】

本開示のCARのある特定の実施形態では、エンドドメインは、ヒトCD3ζエンドドメインを含んでもよい。

【0010】

本開示のCARのある特定の実施形態では、少なくとも1つの共刺激ドメインは、ヒト4-1BB、CD28、CD40、ICOS、MyD88、OX-40細胞内セグメント、またはこれらの任意の組み合わせを含んでもよい。本開示のCARのある特定の実施形態では、少なくとも1つの共刺激ドメインは、CD28および／または4-1BB共刺激ドメインを含んでもよい。CD28共刺激ドメインは、RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号6)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号6)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。CD28共刺激ドメインは、c g c g t g a a g t t t a g t c g a t c a g c a g a t g c c c c a g c t t a c a a a c a g g g a c a g a a c c a g c t g t a t a a c g a g c t g a a t c t g g g c c g c c g a g a g g a a t a t g a c g t g c t g g a t a a g c g g a g a g g a c g c g a c c c c g a a a t g g g a g g c a a g c c c a g g c g c a a a a a c c c t c a g g a a g g c c t g t a t a a c g a g c t g c a g a a g g a c a a a a t g g c a g a a g c c t a t t c t g a g a t c g g c a t g a a g g g g a g c g a c g g a g a g g c a a a g g g c a c g a t g g g c t g t a c c a g g g a c t g a g c a c c g c c a c a a a g g a c a c c t a t g a t g c t c t g c a t a t g c a g g c a c t g c c t c c a a g g (配列番号7)を含む核酸配列によりコードされていてもよい。4-1BB共刺激ドメインは、KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (配列番号8)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (配列番号8)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。4-1BB共刺激ドメインは、a a g a g a g g c a g g a a g a a a c t g c t g t a t a t t t t c a a a c a g c c c t t c a t g c g c c c c g t g c a g a c t a c c c a g g a g g a a g a c g g g t g c t c c t g t c g a t t c c c t g a g g a a g a g g a a g g c g g g t g t g a g c t g (配列番号9)を含む核酸配列によりコードされていてもよい。4-1BB共刺激ドメインは、膜貫通ドメインとCD28共刺激ドメインの間に位置してもよい。

【0011】

本開示のCARのある特定の実施形態では、ヒンジは、ヒトCD8α、IgG4および／またはCD4配列に由来する配列を含んでもよい。本開示のCARのある特定の実施形態では、ヒンジは、ヒトCD8α配列に由来する配列を含んでもよい。ヒンジは、TTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CD (配列番号10)を含むヒトCD8αアミノ酸配列を含んでもよく、またはTTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CD (配列番号10)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。ヒトCD8αヒンジアミノ酸配列は、a c t a c c a c a c c a g c a c c t a g a c c a c c a a c t c c a g c t c c a a c c a t c g c g a g t c a g c c c c t g a g t c t g a g a c c t g a g g

c c t g c a g g c c a g c t g c a g g a g g a g c t g t g c a c a c c a g g g g
c c t g g a c t t c g c c t g c g a c (配列番号 11) を含む核酸配列によりコード
されているもよい。

【0012】

本開示の C e n t y r i n は、タンパク質足場を含んでもよく、足場は抗原に特異的に結合することができる。本開示の C e n t y r i n は、少なくとも 1 つのフィブロネクチン I I I 型 (F N 3) ドメインのコンセンサス配列を含むタンパク質足場を含んでもよく、足場は抗原に特異的に結合することができる。少なくとも 1 つのフィブロネクチン I I I 型 (F N 3) ドメインはヒトタンパク質に由来することがある。ヒトタンパク質はテネイシン-C でありうる。コンセンサス配列は、

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGAEINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRS
NPLSAEFTT (配列番号 1) または MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGAEINLTVP
GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (配列番号 13) を含んでもよい。コンセン
サス配列は、

atgctgcctgcaccaaagaacctgggtggtgtctcatgtgacagaggatagtgccagactgtcatggactgtctcccgacgc
agccttcgatagttttatcatcggtgtaccgggagaacatcgaaaccggcgaggccattgtcctgacagtgccagggtccg
aacgctcttatgacctgacagatctgaagcccgaactgagtactatgtgcagatcgccggcggtcaaaggaggcaatatc
agcttccctctgtccgcaatcttcaccaca (配列番号 14) を含む核酸配列によってコードされう
る。コンセンサス配列は、(a) コンセンサス配列の 13~16 位におけるアミノ酸残基
T E D S (配列番号 15) を含む、もしくはそれからなる A-B ループ、(b) コンセン
サス配列の 22~28 位におけるアミノ酸残基 T A P D A A F (配列番号 16) を含む、
もしくはそれからなる B-C ループ、(c) コンセンサス配列の 38~43 位におけるア
ミノ酸残基 S E K V G E (配列番号 17) を含む、もしくはそれからなる C-D ループ、
(d) コンセンサス配列の 51~54 位におけるアミノ酸残基 G S E R (配列番号 18)
を含む、もしくはそれからなる D-E ループ、(e) コンセンサス配列の 60~64 位に
おけるアミノ酸残基 G L K P G (配列番号 19) を含む、もしくはそれからなる E-F ル
ープ、(f) コンセンサス配列の 75~81 位におけるアミノ酸残基 K G G H R S N (配
列番号 20) を含む、もしくはそれからなる F-G ループ、または (g) (a) ~ (f)
の任意の組み合わせの中の 1 つまたは複数の位置が修飾されていることがある。本開示の
C e n t y r i n は、少なくとも 5 個のフィブロネクチン I I I 型 (F N 3) ドメイン、
少なくとも 10 個のフィブロネクチン I I I 型 (F N 3) ドメインまたは少なくとも 15
個のフィブロネクチン I I I 型 (F N 3) ドメインのコンセンサス配列を含んでもよい。
足場は、 10^{-9} M またはそれ未満の、 10^{-10} M またはそれ未満の、 10^{-11} M ま
たはそれ未満の、 10^{-12} M またはそれ未満の、 10^{-13} M またはそれ未満の、 10^{-14} M
またはそれ未満の、および 10^{-15} M またはそれ未満の K_D から選択される少
なくとも 1 つのアフィニティーで、抗原に結合することができる。 K_D は、表面プラズモン
共鳴によって決定してもよい。

【0013】

本開示は、

【化 1】

MG VQ VET I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K V D S S R D R N K P F K F M L G K Q E
 V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E G G G G
 S G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R
 R R F S S L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A Q Q D H G A L D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P
 G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D
 E S P G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V
 E T L D D I F E Q W A H S E D L Q S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F F K T S G S G E G
 R G S L L T C G D V E E N P G P M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P M L P A P K N L V V S R I T E D S A R
L S W T A P D A A F D S F P I R Y I E T L I W G E A I W L D V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y A V V I T G
V K G G R F S S P L V A S F T T T T T P A P R P T P A P T I A S Q P L S L R P E A C R P A A G G A V H T R G L D F
 A C D I Y I W A P L A G T C G V L L L S L V I T L Y C K R G R K K L L Y I F K Q P F M R P V Q T T Q E E D G C S C R
 F P E E E E G G C E L R V K F S R S A D A P A Y K Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D P E M
 G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T
 Y D A L H M Q A L P P R G S G E G R G S L L T C G D V E E N P G P M V G S L N C I V A V S Q N M G I G K N G D F
 P W P P L R N E S R Y F Q R M T T T S S V E G K Q N L V I M G K K T W F S I P E K N R P L K G R I N L V L S R E L
 K E P P Q G A H F L S R S L D D A L K L T E Q P E L A N K V D M V W I V G G S S V Y K E A M N H P G H L K L F V
 T R I M Q D F E S D T F F P E I D L E K Y K L L P E Y P G V L S D V Q E E K G I K Y K F E V Y E K N D

10

20

30

40

50

（配列番号 21、太字の配列は A08 Centyrin のアミノ酸配列を含む）を含む
 アミノ酸配列を有する抗 B C M A C A R T y r i n（本明細書において A08 と呼ばれ
 る）を提供する。ある特定の実施形態では、本開示の A08 C A R T y r i n は、

atgggggtccaggctcgagactatctcaccaggggatggcgcaacatttccaaaaaggggccagacttgcgtcgatgacatta
 caccgggatgctggaggacgggaagaaagtgacagctccagggatcgcaacaagcccttcaagttcatgctgggaaagc
 aggaagtgatccgaggatgggaggaaggcgtggcacagatgtcagtcggccagcgggccaactgaccattagccctgac
 tacgcttatggagcaacaggccaccagggatcattccccctcatgccaccctggcttctgatgtggaactgctgaagct
 ggaggaggaggaggatccggatttggggacgtgggggccctggagctctctgcgaggaaatgccgatctggcttacatcc
 tgagcatggaacctgcgccactgtctgatcattaacaatgtgaacttctgcagagaaagcggactgccaacacggact
 ggctccaatatgactgtgagaagctgcggaagaaggttctctagctgtgactttatggtcgaagtgaagggggatctgac
 cgccaagaaaaatgggtgctggccctgctggagctggctcagcaggaccatggagctctggattgctgcgtggctcgatcc
 gtccacgggtgccaggcttctcatctgcagttccccggagcagtgtagcgaacagacggctgtcctgtcagcgtggag
 aagatcgtaacaacttcaacggcacttcttgccctagctctgggggaaagccaaaactgttctttatccaggcctgtgg
 cggggaacagaaagatcacggcttcgaggtggccagcaccagccctgaggacgaatcaccaggaggacaacctgaaccag
 atgcaactccattccaggagggactgaggaccttgaccagctggatgctatctcaagcctgccactcctagtacatt
 ttcgtgtcttacagtaccttcccaggctttgtctcatggcgcatcccaagtcaggagctggtagctggagacactgga
 cgacatctttgaacagtgggcccattcagaggacctgcagagcctgctgctgcagtgaggcaaacgctgtctctgtgaagg
 gcattcacaacagatgcccggtgcttcaatttctgagaaagaaactgttctttaagacttccggatctggagaggga
 aggggaagcctgtgacgtgtggagacgtggaggaaaaccaggaccaatggcactgccagtcaccgccctgtgctgcc
 tctggctgtgctgtgcacgcagctagaccaatgtgcctgcacaaagaacctgggtggtgagccggatcacagaggact
 ccgccagactgtcttgaccgccccgtgacgcccttcgattcctttccaatccggtacatcgagacactgatctggggc
 gaggccatctggctggacgtgcccggtctgagaggagctacgatctgacaggcctgaagcctggcaccgagtatgcagt
 ggtcatcacaggagtgaaggcgccagggttcagctccccctctgggtggcctcttttaccacaaccacaacccctgccccca
 gacctccacacccgccccctaccatcgcgagtcagccccctgagctctgagacctgaggcctgcaggccagctgcaggagga
 gctgtgcacaccaggggcctggacttcgcctgcgacatctacatttggggcaccactggccgggacctgtggagtgtgct
 gctgagcctggatcatcacactgtactgcaagagaggcaggaagaaactgtgtatattttcaaacagcccttcatgcgc

ccgtgcagactacccaggaggaagacgggtgctcctgtcgattccctgaggaagaggaaggcggtgtgagctgcgcgtg
aagtttagtcgatcagcagatgccccagcttacaaacagggacagaaccagctgtataacgagctgaatctgggccgccg
agaggaatatgacgtgctggataaagcggagaggacgcgacccccgaaatgggaggcaagcccaggcgcaaaaaccctcagg
aaggcctgtataacgagctgcagaaggacaaaaatggcagaagcctattctgagatcggcgatgaagggggagcgacggaga
ggcaaagggcacgatgggctgtaccagggactgagcaccgccacaaaggacacctatgatgctctgcatatgcaggcact
gcctccaaggggaagtggagaaggacgaggatcactgctgacatgcggcgacgtggaggaaaaccctggcccaatggtcg
ggtctctgaattgtatcgtcgccgtgagtcagaacatgggcattgggaagaatggcgatttcccatggccacctctgcgc
aacgagctcccgatactttcagcggatgacaactacctcctctgtggaagggaaacagaatctggtcatcatgggaaagaa
aacttggttcagcattccagagaagaaccggccccctgaaaggcagaatcaatctggtgctgtcccgagaactgaaggagc
caccacaggagctcactttctgagccggtccctggacgatgcactgaagctgacagaacagcctgagctggccaacaaa
gtcgatatggtgtggatcgctcgggggaagttcagtgtataaggaggccatgaatcaccccgccatctgaaactgttcgt
cacacggatcatgcaggactttgagagcgatactttctttcctgaaattgacctggagaagtacaaactgctgcccgaat
atcctggcgctgctgtccgatgtccaggaagagaaaaggcatcaaatacaagttcgagggtctatgagaagaatgac (配列
番号 22、この配列は本明細書において P-BMCA-101 のオープンリーディングフ
レーム (ORF) と呼ばれる) を含む核酸配列によってコードされていてもよい。

10

【0014】

本開示は、本開示の CAR および少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

【0015】

本開示は本開示の CAR を含むトランスポゾンを提供する。

20

【0016】

本開示のトランスポゾンは、トランスポゾンを発現する細胞の同定、濃縮および／または単離のための選択遺伝子 (selection gene) を含んでもよい。例示的な選択遺伝子は、細胞生存度および生存に不可欠な任意の遺伝子産物 (例えば、転写物、タンパク質、酵素) をコードする。例示的な選択遺伝子は、細胞が、選択遺伝子によりコードされている遺伝子産物の非存在下で感受性である (または細胞に対して致死性でありうる) 薬物負荷に対する耐性の付与に不可欠な任意の遺伝子産物 (例えば、転写物、タンパク質、酵素) をコードする。例示的な選択遺伝子は、選択遺伝子の非存在下での細胞生存度および／または生存に不可欠な 1 つまたは複数の栄養素を欠いている細胞培地中での生存度および／または生存に不可欠な任意の遺伝子産物 (例えば、転写物、タンパク質、酵素) をコードする。例示的な選択遺伝子は、neo (ネオマイシンに対する耐性を付与する)、DHFR (ジヒドロ葉酸レダクターゼをコードし、メトトレキサートに対する耐性を付与する)、TYMS (チミジル酸シンテターゼをコードする)、MGMT (O (6) -メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼをコードする)、多剤耐性遺伝子 (MDR1)、ALDH1 (アルデヒドデヒドロゲナーゼ 1 ファミリー、メンバー A1 をコードする)、FRANCF、RAD51C (RAD51 パラログ C をコードする)、GCS (グルコシルセラミドシンターゼをコードする)、および NKX2.2 (NK2 ホメオボックス 2 をコードする) を含むが、これらに限定されない。

30

【0017】

本開示のトランスポゾンは、(a) リガンド結合領域と、(b) リンカーと、(c) アポトーシス促進性ポリペプチド (proapoptotic polypeptide) とを含む誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドであって、非ヒト配列を含まない誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを含んでもよい。ある特定の実施形態では、非ヒト配列は、制限部位を含む。ある特定の実施形態では、リガンド結合領域は、多量体リガンド結合領域であってもよい。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは、「iC9 安全スイッチ」と称されることもある。ある特定の実施形態では、本開示のトランスポゾンは、(a) リガンド結合領域と、(b) リンカーと、(c) カスパーゼポリペプチドとを含む誘導性カスパーゼポリペプチドを含んでもよく、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは非ヒト配列を含まない。ある特定の実施形態では、本開示のトランスポゾンは、(a) リガンド結合領域と、(b) リンカーと、(c) カスパーゼポリペプチドとを含む誘

40

50

導性カスパーゼポリペプチドを含んでもよく、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは非ヒト配列を含まない。ある特定の実施形態では、本開示のトランスポゾン、(a) リガンド結合領域と、(b) リンカーと、(c) 切断型カスパーゼ9ポリペプチドとを含む誘導性カスパーゼポリペプチドを含んでもよく、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは非ヒト配列を含まない。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、リガンド結合領域は、FK506結合タンパク質12(FKBP12)ポリペプチドを含んでもよい。ある特定の実施形態では、FK506結合タンパク質12(FKBP12)ポリペプチドを含むリガンド結合領域のアミノ酸配列は、該配列の36位に修飾を含んでもよい。修飾は、36位におけるフェニルアラニン(F)からバリン(V)への置換(F36V)であってもよい。ある特定の実施形態では、FKBP12ポリペプチドは、GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDS SRDRNKPFKFM L GKQEVIRGWEEGVAQMSVGGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL KLE(配列番号23)を含むアミノ酸配列によりコードされている。ある特定の実施形態では、FKBP12ポリペプチドは、GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCA C CAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAGGGGCCAGACTTGC GTCTCGTGCA TTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTTGGACAGCTCCAGGGATCGCAACAAAGCCCTTCAAGTTTCATGCTGGGAAGCAGGAAGTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGC GTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGGCCAAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATCATTTCCCCCTCATGCCACCCCTGGTCTTTCGAT GTGGAACTGCTGAAGCTGGAG(配列番号24)を含む核酸配列によりコードされている。ある特定の実施形態では、36位にフェニルアラニン(F)からバリン(V)への置換(F36V)を有するFK506結合タンパク質12(FKBP12)ポリペプチドを含んでもよいリガンド結合領域に特異的な誘導剤は、AP20187および/またはAP1903を含み、これらは両方とも合成薬物である。

【0018】

本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、リンカー領域は、GGGGS(配列番号25)を含むアミノ酸またはGGAGGAGGAGGATCC(配列番号26)を含む核酸配列によりコードされている。ある特定の実施形態では、リンカーをコードする核酸配列は、制限部位を含まない。

【0019】

本開示の切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、切断型カスパーゼ9ポリペプチドは、その配列の87位にアルギニン(R)を含まないアミノ酸配列によりコードされている。あるいは、または加えて、本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、切断型カスパーゼ9ポリペプチドは、その配列の282位にアラニン(A)を含まないアミノ酸配列によりコードされている。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、切断型カスパーゼ9ポリペプチドは、GFGDVGALES LRGNADLAYISLMEPCGHCL I INNVNFCRESGLRTRTG SNIDCEKLR RRFSS LHF MV E VKGDLTAKKMVLALL ELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGC PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGF E VASTSPEDESPG SNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLP T P S D I FVSYSTFP GFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQS LLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS(配列番号27

）を含むアミノ酸、またはTTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCT
TGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACATCCTGAGCATGGAA
ACCTTGCGGGCCACTGTCTGATCATTTAACAAATGTGAACCTTC
TGCAGAGAAAGCGGGA CTGCGAACAACGGACTGGCTCCAAATA
TTGACTGTGAGAAAGCTGCGGAGAAAGGTTCTCTTAGTCTTGCA
CTTTATGGTTCGAAGTGAAGAGGGGATCTGACCGCCAAAGAAA
ATGGTGCTGGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATG
GAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTTCGTGATCCTGTCCACGG
GTGCCAGGCTTCTCATCTGCA GTTCCCCGGAGCAGTGTAC
GGAACAGACGGGCTGTCTCTGTCAGCGTGGAGAAAGATCGTCA
ACATCTTCAACGGGC ACTTCTTTGCCCTAGTCTGGGGGGGAAA
GCCAAAACCTGTTCTTTATCCAGGCCCTGTGGCGGGGAAACAG
AAAGATCACGGGCTTCGAGGTGGCCAGCACCCAGCCCTGAGG
ACGAATCACCCAGGGAGCAACCCCTGAACCAAGATGCAACTCC
ATTCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAAGCTGGATGCT
ATCTCAAGCCCTGCCCACTCCTAGTGACATTTTCTGTGTCTT
ACAGTACCTTCCCAGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAA
GTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGAGCAGCATCTTT
GAACAGTGGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCCTGCTGC
TGCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAA
ACAGATGCCCGGGTGCTTCAATTTTCTGAGAAAGAAACTG
TTCTTTTAAGACTTCC（配列番号28）を含む核酸配列によりコードされてい
る。

10

20

【0020】

切断型カスパーゼ9ポリペプチドを含む、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのあ
る特定の実施形態では、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは、GVQVETISP
GDGRTFPKRGQT CVVHYTGML EDGKKVDS SRDRNKP FKF
L GKQEVI RGWEEGVAQMSV GQRAKLTI SPDYAYGATGHPG
I I PPHATLVFDVELL KLEGGGGSGFGDVGAL ESLRGNAD
LAYISLMEPCGHCL I INNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL
RRRFSSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCC
VVVILSHGCQASHLQFPGAVYGT DGC PVSVEKIVNIFNGT
SCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGF E VASTSPEDESPGS
NPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLP T PSDIFVSYSTFP
FVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANA
VSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS（配列番号29）を含むアミノ酸
配列、またはGGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCAACCAAGGGGATG
GGCGAACATTTCCAAAAAGGGGCCAGACTTGCCTCGTGCA
TTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTGGACAGC
TCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTT CATGCTGGGAA
AGCAGGAAGTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGC GTGGCACA
GATGTCAGTCCGGCCAGCGGGCCAAACTGACCAATTAGCCCT
GACTACGCTTATGGAGCAACAAGGCCACCCAGGGATCATTC
CCCCCTCATGCCACCCCTGGTCTTTCGATGTGGAACTGCTGAA
GCTGGAGGGAGGAGGAGGATCCGAATTTGGGGACGTGGGG
GCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACA
TCCTGAGCATGGAACCCCTGCGGGCCACTGTCTGATCATTA
CAATGTGAACCTTCTGCAAGAGAAAGCGGACTGCGAACAACGG
ACTGGCTCCAATATTGACTGTGAGAAAGCTGCGGAGAAAGGT
TCTCTAGTCTGCAC TTTATGGTTCGAAGTGAAAGGGGATCT

30

40

50

G A C C G C C A A G A A A A T G G T G C T G G C C C T G C T G G A G C T G G C T
C A G C A G G A C C A T G G A G C T C T G G A T T G C T G C G T G G T C G T G A
T C C T G T C C C A C G G G T G C C A G G C T T C T C A T C T G C A G T T C C C
C G G A G C A G T G T A C G G A A C A G A C G G C T G T C C T G T C A G C G T G
G A G A A G A T C G T C A A C A T C T T C A A C G G C A C T T C T T G C C C T A
G T C T G G G G G A A A G C C A A A A C T G T T C T T T A T C C A G G C C T G
T G G C G G G G A A C A G A A A G A T C A C G G C T T C G A G G T G G C C A G C
A C C A G C C C T G A G G A C G A A T C A C C A G G G A G C A A C C C T G A A C
C A G A T G C A A C T C C A T T C C A G G A G G G A C T G A G G A C C T T T G A
C C A G C T G G A T G C T A T C T C A A G C C T G C C C A C T C C T A G T G A C
A T T T T C G T G T C T T A C A G T A C C T T C C C A G G C T T T G T C T C A T
G G C G C G A T C C C A A G T C A G G G A G C T G G T A C G T G G A G A C A C T
G G A C G A C A T C T T T G A A C A G T G G G C C C A T T C A G A G G A C C T G
C A G A G C C T G C T G C T G C G A G T G G C A A A C G C T G T C T C T G T G A
A G G G C A T C T A C A A A C A G A T G C C C G G G T G C T T C A A T T T T C T
G A G A A A G A A A C T G T T C T T T A A G A C T T C C (配列番号30)を含む核
酸配列によりコードされている。

【0021】

本開示のトランスポゾン、例えば、本開示のタンパク質足場、CentyrinまたはCARTyrinのうちの1つまたは複数と本開示の選択遺伝子との間に位置する、少なくとも1つの自己切断ペプチドを含んでもよい。本開示のトランスポゾンは、例えば、本開示のタンパク質足場、CentyrinまたはCARTyrinのうちの1つまたは複数と本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドとの間に位置する、少なくとも1つの自己切断ペプチドを含んでもよい。本開示のトランスポゾンは、少なくとも2つの自己切断ペプチド、例えば本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの上流または直ぐ上流に位置する、第1の自己切断ペプチド、および例えば本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの下流または直ぐ上流に位置する、第2の自己切断ペプチドを含んでもよい。

【0022】

少なくとも1つの自己切断ペプチドは、例えば、T2Aペプチド、GSG-T2Aペプチド、E2Aペプチド、GSG-E2Aペプチド、F2Aペプチド、GSG-F2Aペプチド、P2Aペプチド、またはGSG-P2Aペプチドを含んでもよい。T2Aペプチドは、EGRGSLLTCTG DVEENPGP (配列番号31)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはEGRGSLLTCTG DVEENPGP (配列番号31)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-T2Aペプチドは、GSGEGRGSLLTCTG DVEENPGP (配列番号32)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはGSGEGRGSLLTCTG DVEENPGP (配列番号32)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-T2Aペプチドは、ggatctggagagggaagggaagccctgctgacctgtggagacgtggaggaaaccaggaacca (配列番号33)を含む核酸配列を含んでもよい。E2Aペプチドは、QCTNYALLKLAGDVEENPGP (配列番号34)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはQCTNYALLKLAGDVEENPGP (配列番号34)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-E2Aペプチドは、GSGQCTNYALLKLAGDVEENPGP (配列番号35)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはGSGQCTNYALLKLAGDVEENPGP (配列番号35)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。F2Aペプチドは、VKQTLNFDLLKLAGDVEENPGP (配列番号36)を含むアミ

ノ酸配列を含んでもよく、またはVKQTLNFDLLKL AGDVESNPGP（配列番号36）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-F2Aペプチドは、GSGVKQTLNFDLLKL AGDVESNPGP（配列番号37）を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはGSGVKQTLNFDLLKL AGDVESNPGP（配列番号37）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。P2Aペプチドは、ATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号38）を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号38）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-P2Aペプチドは、GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号39）を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号39）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。

【0023】

本開示のトランスポゾン、第1および第2の自己切断ペプチドであって、例えば本開示のタンパク質足場、CentyrinまたはCARTyrinのうちの1つまたは複数の上流に位置する、第1の自己切断ペプチド、および例えば本開示のタンパク質足場、CentyrinまたはCARTyrinのうちの1つまたは複数の下流に位置する、第2の自己切断ペプチドを含んでもよい。第1および/または第2の自己切断ペプチドは、例えば、T2Aペプチド、GSG-T2Aペプチド、E2Aペプチド、GSG-E2Aペプチド、F2Aペプチド、GSG-F2Aペプチド、P2Aペプチド、またはGSG-P2Aペプチドを含んでもよい。T2Aペプチドは、EGRGSLLTTCGDVEENPGP（配列番号31）を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはEGRGSLLTTCGDVEENPGP（配列番号31）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-T2Aペプチドは、GSGEGRGSLLTTCGDVEENPGP（配列番号32）を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはGSGEGRGSLLTTCGDVEENPGP（配列番号32）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-T2Aペプチドは、ggatctggagagggaagggaaggcctgctgacctgtggagacgtggaggaaaccaggaacca（配列番号33）を含む核酸配列を含んでもよい。E2Aペプチドは、QCTNYALLKL AGDVESNPGP（配列番号34）を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはQCTNYALLKL AGDVESNPGP（配列番号34）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-E2Aペプチドは、GSGQCTNYALLKL AGDVESNPGP（配列番号35）を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはGSGQCTNYALLKL AGDVESNPGP（配列番号35）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。F2Aペプチドは、VKQTLNFDLLKL AGDVESNPGP（配列番号36）を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはVKQTLNFDLLKL AGDVESNPGP（配列番号36）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-F2Aペプチドは、GSGVKQTLNFDLLKL AGDVESNPGP（配列番号37）を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはGSGVKQTLNFDLLKL AGDVESNPGP（配列番号37）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。P2Aペプチドは、ATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号38）を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号38）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは

10

20

30

40

50

99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-P2Aペプチドは、GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号39）を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号39）を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。

【0024】

本開示は、本開示のトランスポゾンを含む組成物を提供する。ある特定の実施形態では、組成物は、トランスポザーゼ酵素をコードする配列を含むプラスミドをさらに含むことがある。トランスポザーゼ酵素をコードする配列は、mRNA配列であってもよい。

【0025】

本開示のトランスポゾンは、piggyBacトランスポゾンを含んでもよい。本方法のある特定の実施形態では、トランスポゾンは、キメラ抗原受容体をコードする配列が2つのシス調節性インスレーターエレメントによって挟まれている、プラスミドDNAトランスポゾンである。ある特定の実施形態では、トランスポゾンはpiggyBacトランスポゾンである。本開示のトランスポザーゼ酵素は、piggyBacトランスポザーゼまたは適合性酵素を含みうる。ある特定の実施形態では、特に、トランスポゾンがpiggyBacトランスポゾンである実施形態では、トランスポザーゼは、piggyBac（商標）またはSuper piggyBac（商標）（SPB）トランスポザーゼである。ある特定の実施形態では、特に、トランスポザーゼがSuper piggyBac（商標）（SPB）トランスポザーゼである実施形態では、トランスポザーゼをコードする配列は、mRNA配列である。

【0026】

本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、piggyBac（商標）（PB）トランスポザーゼ酵素である。piggyBac（PB）トランスポザーゼ酵素は、下記のものとは少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%またはこれらの間の任意の百分率において同一のアミノ酸配列を含んでもよい、またはそれからなってもよい：

【化2】

```

1  MGSSLDDEHI  LSALLQSDDE  LVGEDSDSEI  SDHVSDDVQ  SDTEEFIDE  VHEVQPTSSG
61  SEILDEQNV  EQPGSSLASN  RILTLPORTI  RGKNKHCWST  SKSTRRSRVS  ALNIVRSQRG
121 PTRMCRNIYD  PLLCFKLFFT  DEIISEIVKW  TNAEISLKRR  ESMTGATFRD  TNEDEIYAFF
181 GILVMTAVRK  DNHMSTDDLF  DRSLSMVYVS  VMSRDRFDL  IRCLRMDDKS  IRPTLRENDV
241 FTPVRKIWDL  FIHQCIQNYT  PGAHLTIDEQ  LLGFRGRCPF  RMYIPNKPSK  YGIKILMMCD
301 SGYKYMINGM  PYLGRGTQTN  GVPLGEYYVK  ELSKPVHGSC  RNITCDNWFT  SIPLAKNLLQ
361 EPYKLTIVGT  VRSNKREIPE  VLKNSRSRPV  GTSMFCFDGP  LTLVSYKPKP  AKMVYLLSSC
421 DEDASINEST  GKPQMVMYYN  QTKGGVDTL  QMCSVMTCSR  KTNRWPMALL  YGMINIACIN
481 SFIIYSHNVS  SKGEKVQSRK  KFMRNLYMSL  TSSFMRKRLE  APTLKRYLRD  NISNILPNEV
541 PGTSDDSTEE  PVMKKRTYCT  YCPSKIRKKA  NASCKKCKKV  ICREHNIDMC  QSCF ( 配列番号
12) .

```

【0027】

本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、下記の配列の30、165、282もしくは538位のうちの1つもしくは複数にアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、piggyBac（商標）（PB）トランスポザーゼ酵素である：

10

20

30

40

【化 3】

1 MGSSLDDEHI LSALLQSDDE LVGEDSDSEI SDHVSDDVQ SDTEEFIDE VHEVQPTSSG
 61 SEILDEQNVI EQPGSSLASN RILTLPQRTI RGKNKHCWST SKSTRRSRVS ALNIVRSQRG
 121 PTRMCRNIYD PLLCFKLFFT DEIISEIVKW TNAEISLKRR ESMTGATFRD TNEDEIYAFF
 181 GILVMTAVRK DNHMSTDDLF DRSLSMVYVS VMSRDRFDFL IRCLRMDDKS IRPTLRENDV
 241 FTPVRKIWDL FIHQCIQNYT PGAHLTIDEQ LLGFRGRCPF RMYIPNKPSK YGIKILMMCD
 301 SGYKYMINGM PYLGRGTQTN GVPLGEYYVK ELSKPVHGSC RNITCDNWFT SIPLAKNLLQ
 361 EPYKLTIVGT VRSNKREIPE VLKNSRSRPV GTSMFCFDGP LTLVSYKPKP AKMVYLLSSC
 421 DEDASINEST GKPQMVMYYN QTKGGVDTLD QMCSVMTCR KTNRPWPMALL YGMINIACIN
 481 SFIIYSHNVS SKGEKVQSRK KFMRLNLYMSL TSSFMRKRLE APTLKRYLRD NISNILPNEV
 541 PGTSDDSTEE PVMKKRTYCT YCPSKIRKKA NASCKKCKKV ICREHNIDMC QSCF (配列番号
 12).

10

【0028】

ある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、配列番号12の配列の30、165、282もしくは538位のうちの2つもしくはそれより多くにアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、p i g g y B a c (商標) (PB) トランスポザーゼ酵素である。ある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、配列番号12の配列の30、165、282もしくは538位のうちの3つもしくはそれより多くにアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、p i g g y B a c (商標) (PB) トランスポザーゼ酵素である。ある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、配列番号12の配列の30、165、282および538位の各々にアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、p i g g y B a c (商標) (PB) トランスポザーゼ酵素である。ある特定の実施形態では、配列番号12の配列の30位におけるアミノ酸置換は、イソロイシン (I) からバリン (V) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12の配列の165位におけるアミノ酸置換は、グリシン (G) からセリン (S) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12の配列の282位におけるアミノ酸置換は、メチオニン (M) からバリン (V) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12の配列の538位におけるアミノ酸置換は、アスパラギン (N) からリシン (K) への置換である。

20

30

【0029】

本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、Super p i g g y B a c (商標) (sPB o) トランスポザーゼ酵素である。ある特定の実施形態では、本開示のSuper p i g g y B a c (商標) (sPB o) トランスポザーゼ酵素は、30位におけるアミノ酸置換が、イソロイシン (I) からバリン (V) への置換であり、165位におけるアミノ酸置換が、グリシン (G) からセリン (S) への置換であり、282位におけるアミノ酸置換が、メチオニン (M) からバリン (V) への置換であり、538位におけるアミノ酸置換が、アスパラギン (N) からリシン (K) への置換である、配列番号12の配列のアミノ酸配列を含んでもよい、またはそれからなってもよい。ある特定の実施形態では、Super p i g g y B a c (商標) (sPB o) トランスポザーゼ酵素は、下記のもの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%またはこれらの間の任意の百分率において同一のアミノ酸配列を含んでもよい、またはそれからなってもよい：

40

【化 4】

1 MGSSLDDEHI LSALLQSDDE LVGEDSDSEV SDHVSDDVQ SDTEEFIDE VHEVQPTSSG
 61 SEILDEQNV I EQPGSSLASN RILTLPQRTI RGKNKHCWST SKSTRRSRVS ALNIVRSQRG
 121 PTRMCRNIYD PLLCFKLFFT DEIISEIVKW TNAEISLKRR ESMTSATFRD TNEDEIYAFF
 181 GILVMTAVRK DNHMSTDDL F DRSLSMVYVS VMSRDRFDFL IRCLRMDDKS IRPTLRENDV
 241 FTPVRKIWDL FIHQCIQNYT PGAHLTIDEQ LLGFRGRCPF RVYIPNKPSK YGIKILMMCD
 301 SGTMYMINGM PYLGRGTQTN GVPLGEYYVK ELSKPVHGSC RNITCDNWFT SIPLAKNLLQ
 361 EPYKLTIVGT VRSNKREIPE VLKNSRSRPV GTSMFCFDGP LTLVSYKPKP AKMVYLLSSC
 421 DEDASINEST GKPQMVMYN QTKGGVDTL D QMCSVMTCSR KTNRWPMALL YGMINIACIN
 481 SFIIYSHNVS SKGEKVQSRK KFMRLNLYMSL TSSFMKRRL E APTLKRYLRD NISNILPKEV
 541 PGTSDDSTEE PVMKKRTYCT YCPSKIRKKA NASCKKCKKV ICREHNIDMC QSCF (配列番号
 2)。

10

【0030】

トランスポザーゼが30、165、282および／または538位に上記の変異を含む実施形態を含む、本開示の方法のある特定の実施形態では、p i g g y B a c (商標)またはSuper p i g g y B a c (商標)トランスポザーゼ酵素は、配列番号12または配列番号2の配列の3、46、82、103、119、125、177、180、185、187、200、207、209、226、235、240、241、243、258、296、298、311、315、319、327、328、340、421、436、456、470、486、503、552、570および591位のうちの1つまたは複数にアミノ酸置換をさらに含んでもよい。トランスポザーゼが30、165、282および／または538位に上記の変異を含む実施形態を含む、ある特定の実施形態では、p i g g y B a c (商標)またはSuper p i g g y B a c (商標)トランスポザーゼ酵素は、46、119、125、177、180、185、187、200、207、209、226、235、240、241、243、296、298、311、315、319、327、328、340、421、436、456、470、485、503、552および570位のうちの1つまたは複数にアミノ酸置換をさらに含んでもよい。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の3位におけるアミノ酸置換は、セリン(S)からアスパラギン(N)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の46位におけるアミノ酸置換は、アラニン(A)からセリン(S)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の46位におけるアミノ酸置換は、アラニン(A)からスレオニン(T)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の82位におけるアミノ酸置換は、イソロイシン(I)からトリプトファン(W)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の103位におけるアミノ酸置換は、セリン(S)からプロリン(P)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の119位におけるアミノ酸置換は、アルギニン(R)からプロリン(P)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の125位におけるアミノ酸置換は、システイン(C)からアラニン(A)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の125位におけるアミノ酸置換は、システイン(C)からロイシン(L)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の177位におけるアミノ酸置換は、チロシン(Y)からリシン(K)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の177位におけるアミノ酸置換は、チロシン(Y)からヒスチジン(H)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の180位におけるアミノ酸置換は、フェニルアラニン(F)からロイシン(L)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の180位におけるアミノ酸置換は、フェニルアラニン(F)からイソロイシン(I)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の180位におけるアミノ酸置換は、フェニルアラニン(F)からバリン(V)への

20

30

40

50

置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 1 8 5 位におけるアミノ酸置換は、メチオニン (M) からロイシン (L) への置換である。ある特定の
実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 1 8 7 位におけるアミノ酸置換は、アラニ
ン (A) からグリシン (G) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 ま
たは配列番号 2 の 2 0 0 位におけるアミノ酸置換は、フェニルアラニン (F) からトリプ
トファン (W) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号
2 の 2 0 7 位におけるアミノ酸置換は、バリン (V) からプロリン (P) への置換である
。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 0 9 位におけるアミノ酸
置換は、バリン (V) からフェニルアラニン (F) への置換である。ある特定の実施形態
では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 2 6 位におけるアミノ酸置換は、メチオニン (10
M) からフェニルアラニン (F) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1
2 または配列番号 2 の 2 3 5 位におけるアミノ酸置換は、ロイシン (L) からアルギニン
(R) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 1 2 の 2
4 0 位におけるアミノ酸置換は、バリン (V) からリシン (K) への置換である。ある特
定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 4 1 位におけるアミノ酸置換は、
フェニルアラニン (F) からロイシン (L) への置換である。ある特定の実施形態では、
配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 4 3 位におけるアミノ酸置換は、プロリン (P) から
リシン (K) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2
の 2 5 8 位におけるアミノ酸置換は、アスパラギン (N) からセリン (S) への置換であ
る。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 9 6 位におけるアミノ 20
酸置換は、ロイシン (L) からトリプトファン (W) への置換である。ある特定の実施形
態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 9 6 位におけるアミノ酸置換は、ロイシン (L)
からチロシン (Y) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または
配列番号 2 の 2 9 6 位におけるアミノ酸置換は、ロイシン (L) からフェニルアラニン (F)
への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 9 8
位におけるアミノ酸置換は、メチオニン (M) からロイシン (L) への置換である。ある
特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 9 8 位におけるアミノ酸置換は
、メチオニン (M) からアラニン (A) への置換である。ある特定の実施形態では、配列
番号 1 2 または配列番号 2 の 2 9 8 位におけるアミノ酸置換は、メチオニン (M) からバ
リン (V) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 30
3 1 1 位におけるアミノ酸置換は、プロリン (P) からイソロイシン (I) への置換であ
る。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 1 1 位におけるアミノ
酸置換は、プロリン (P) からバリンへの置換である。ある特定の実施形態では、配列番
号 1 2 または配列番号 2 の 3 1 5 位におけるアミノ酸置換は、アルギニン (R) からリシ
ン (K) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3
1 9 位におけるアミノ酸置換は、スレオニン (T) からグリシン (G) への置換である。
ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 2 7 位におけるアミノ酸置
換は、チロシン (Y) からアルギニン (R) への置換である。ある特定の実施形態では、
配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 2 8 位におけるアミノ酸置換は、チロシン (Y) から
バリン (V) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 40
の 3 4 0 位におけるアミノ酸置換は、システイン (C) からグリシン (G) への置換であ
る。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 4 0 位におけるアミノ
酸置換は、システイン (C) からロイシン (L) への置換である。ある特定の実施形態で
は、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 4 2 1 位におけるアミノ酸置換は、アスパラギン酸
(D) からヒスチジン (H) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 ま
たは配列番号 2 の 4 3 6 位におけるアミノ酸置換は、バリン (V) からイソロイシン (I)
) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 4 5 6 位
におけるアミノ酸置換は、メチオニン (M) からチロシン (Y) への置換である。ある特
定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 4 7 0 位におけるアミノ酸置換は、
ロイシン (L) からフェニルアラニン (F) への置換である。ある特定の実施形態では、 50

配列番号12または配列番号2の485位におけるアミノ酸置換は、セリン(S)からリシン(K)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の503位におけるアミノ酸置換は、メチオニン(M)からロイシン(L)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の503位におけるアミノ酸置換は、メチオニン(M)からイソロイシン(I)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の552位におけるアミノ酸置換は、バリン(V)からリシン(K)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の570位におけるアミノ酸置換は、アラニン(A)からスレオニン(T)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の591位におけるアミノ酸置換は、グルタミン(Q)からプロリン(P)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の591位におけるアミノ酸置換は、グルタミン(Q)からアルギニン(R)への置換である。

10

【0031】

トランスポザーゼが30、165、282および／または538位に上記の変異を含む実施形態を含む、本開示の方法のある特定の実施形態では、p i g g y B a c (商標) トランスポザーゼ酵素が、配列番号12もしくは配列番号2の配列の103、194、372、375、450、509および570位のうちの1つもしくは複数にアミノ酸置換を含んでもよく、またはSuper p i g g y B a c (商標) トランスポザーゼ酵素が、そのようなアミノ酸置換をさらに含んでもよい。トランスポザーゼが30、165、282および／または538位に上記の変異を含む実施形態を含む、本開示の方法のある特定の
20
の実施形態では、p i g g y B a c (商標) トランスポザーゼ酵素が、配列番号12または配列番号2の配列の103、194、372、375、450、509および570位のうちの2、3、4、5、6つもしくはそれより多くにアミノ酸置換を含んでもよく、またはSuper p i g g y B a c (商標) トランスポザーゼ酵素が、そのようなアミノ酸置換をさらに含んでもよい。トランスポザーゼが30、165、282および／または538位に上記の変異を含む実施形態を含む、ある特定の実施形態では、p i g g y B a c (商標) トランスポザーゼ酵素が、配列番号12もしくは配列番号2の配列の103、194、372、375、450、509および570位にアミノ酸置換を含んでもよく、またはSuper p i g g y B a c (商標) トランスポザーゼ酵素が、そのようなア
30
ミノ酸置換をさらに含んでもよい。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の103位におけるアミノ酸置換は、セリン(S)からプロリン(P)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の194位におけるアミノ酸置換は、メチオニン(M)からバリン(V)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の372位におけるアミノ酸置換は、アルギニン(R)からアラニン(A)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の375位におけるアミノ酸置換は、リシン(K)からアラニン(A)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の450位におけるアミノ酸置換は、アスパラギン酸(D)からアスパラギン(N)への置換である。ある特定の
40
の実施形態では、配列番号12または配列番号2の509位におけるアミノ酸置換は、セリン(S)からグリシン(G)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の570位におけるアミノ酸置換は、アスパラギン(N)からセリン(S)への置換である。ある特定の実施形態では、p i g g y B a c (商標) トランスポザーゼ酵素は、配列番号12の194位にメチオニン(M)からバリン(V)への置換を含んでもよい。p i g g y B a c (商標) トランスポザーゼ酵素が配列番号12の194位にメチオニン(M)からバリン(V)への置換を含んでもよい実施形態を含む、ある特定の
50
の実施形態では、p i g g y B a c (商標) トランスポザーゼ酵素は、配列番号12または配列番号2の配列の372、375および450位にアミノ酸置換をさらに含んでもよい。ある特定の実施形態では、p i g g y B a c (商標) トランスポザーゼ酵素は、配列番号12の194位にメチオニン(M)からバリン(V)への置換、配列番号12の372位にアルギニン(R)からアラニン(A)への置換、および配列番号12の375位にリ

シン（K）からアラニン（A）への置換を含んでもよい。ある特定の実施形態では、piggyBac（商標）トランスポザーゼ酵素は、配列番号12の194位にメチオニン（M）からバリン（V）への置換、配列番号12の372位にアルギニン（R）からアラニン（A）への置換、配列番号12の375位にリシン（K）からアラニン（A）への置換、および配列番号12の450位にアスパラギン酸（D）からアスパラギン（N）への置換を含んでもよい。

【0032】

本開示は、本開示のCARを含むベクターを提供する。ある特定の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。ベクターは、組換えベクターであってもよい。

【0033】

本開示のウイルスベクターは、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスもしくはこれらの任意の組み合わせから単離された配列を含んでもよく、またはこれらのウイルスもしくはそれらの任意の組み合わせに由来する配列を含んでもよい。ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）から単離された配列を含んでもよく、またはAAVに由来する配列を含んでもよい。ウイルスベクターは、組換えAAV（rAAV）を含んでもよい。本開示の例示的なアデノ随伴ウイルスおよび組換えアデノ随伴ウイルスは、本開示のタンパク質足場、CenturyinまたはCARTyrynをコードする配列の隣にシスで位置する2つまたはそれより多くの末端逆位配列（ITR）を含む。本開示の例示的なアデノ随伴ウイルスおよび組換えアデノ随伴ウイルスは、これらに限定されないが、すべての血清型（例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、およびAAV9）を含む。本開示の例示的なアデノ随伴ウイルスおよび組換えアデノ随伴ウイルスは、これらに限定されないが、自己相補的なAAV（scAAV）、および1つの血清型のゲノムと別の血清型のカプシドとを含むAAVハイブリッド（例えば、AAV2/5、AAV-DJおよびAAV-DJ8）を含む。本開示の例示的なアデノ随伴ウイルスおよび組換えアデノ随伴ウイルスは、これに限定されないが、rAAV-LK03を含む。

【0034】

本開示のウイルスベクターは、選択遺伝子を含んでもよい。選択遺伝子は、細胞生存度および生存に不可欠な遺伝子産物をコードすることができる。選択遺伝子は、選択的細胞培養条件に負荷されたときの細胞生存度および生存に不可欠な遺伝子産物をコードすることができる。選択的細胞培養条件は、細胞生存度または生存に有害な化合物を含むこともあり、遺伝子産物は化合物に対する耐性を付与する。本開示の例示的な選択遺伝子としては、neo（ネオマイシンに対する耐性を付与する）、DHFR（ジヒドロ葉酸レダクターゼをコードし、メトトレキサートに対する耐性を付与する）、TYMS（チミジル酸シンテターゼをコードする）、MGMT（O（6）-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼをコードする）、多剤耐性遺伝子（MDR1）、ALDH1（アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリー、メンバーA1をコードする）、FRANCF、RAD51C（RAD51パラログCをコードする）、GCS（グルコシルセラミドシンターゼをコードする）、NKX2.2（NK2ホメオボックス2をコードする）、またはこれらの任意の組み合わせを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0035】

本開示のウイルスベクターは、（a）リガンド結合領域と、（b）リンカーと、（c）アポトーシス促進性ポリペプチドとを含む誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドであって、非ヒト配列を含まない誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを含んでもよい。ある特定の実施形態では、非ヒト配列は、制限部位を含む。ある特定の実施形態では、リガンド結合領域は、多量体リガンド結合領域であってもよい。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは、「iC9安全スイッチ」と称されることもある。ある特定の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、（a）リガンド結合領域と、（b）リンカーと、（c）カスパーゼポリペプチドとを含む、誘導性カスパーゼポリペプチドであって、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドが非ヒト配列を含まない、誘導性カスパーゼポリペ

10

20

30

40

50

チドを含んでもよい。ある特定の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、(a) リガンド結合領域と、(b) リンカーと、(c) カスパーゼポリペプチドとを含む誘導性カスパーゼポリペプチドであって、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドが非ヒト配列を含まない、誘導性カスパーゼポリペプチドを含んでもよい。ある特定の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、(a) リガンド結合領域と、(b) リンカーと、(c) 切断型カスパーゼ9ポリペプチドとを含む誘導性カスパーゼポリペプチドであって、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドが非ヒト配列を含まない、誘導性カスパーゼポリペプチドを含んでもよい。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、リガンド結合領域は、FK506結合タンパク質12 (FKBP12) ポリペプチドを含んでもよい。ある特定の実施形態では、FK506結合タンパク質12 (FKBP12) ポリペプチドを含むリガンド結合領域のアミノ酸配列は、該配列の36位に修飾を含んでもよい。修飾は、36位におけるフェニルアラニン (F) からバリン (V) への置換 (F36V) であってもよい。ある特定の実施形態では、FKBP12ポリペプチドは、GVQVE T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K V D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E (配列番号23) を含むアミノ酸配列によりコードされている。ある特定の実施形態では、FKBP12ポリペプチドは、GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTTCA C C A G G G G A T G G G C G A A C A T T T C C A A A A A G G G G C C A G A C T T G C G T C G T G C A T T A C A C C G G G A T G C T G G A G G A C G G G A A G A A A G T G G A C A G C T C C A G G G A T C G C A A C A A G C C C T T C A A G T T C A T G C T G G G A A A G C A G G A A G T G A T C C G A G G A T G G G A G G A A G G C G T G G C A C A G A T G T C A G T C G G C C A G C G G G C C A A A C T G A C C A T T A G C C C T G A C T A C G C T T A T G G A G C A A C A G G C C A C C C A G G G A T C A T T C C C C C T C A T G C C A C C C T G G T C T T C G A T G T G G A A C T G C T G A A G C T G G A G (配列番号24) を含む核酸配列によりコードされている。ある特定の実施形態では、36位にフェニルアラニン (F) からバリン (V) への置換 (F36V) を有するFK506結合タンパク質12 (FKBP12) ポリペプチドを含んでもよいリガンド結合領域に特異的な誘導剤は、AP20187および／またはAP1903を含み、これらは両方とも合成薬物である。

【0036】

本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、リンカー領域は、GGGGS (配列番号25) を含むアミノ酸またはGGAGGAGGAGGATCC (配列番号26) を含む核酸配列によりコードされている。ある特定の実施形態では、リンカーをコードする核酸配列は、制限部位を含まない。

【0037】

本開示の切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、切断型カスパーゼ9ポリペプチドは、その配列の87位にアルギニン (R) を含まないアミノ酸配列によりコードされている。あるいは、または加えて、本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、切断型カスパーゼ9ポリペプチドは、その配列の282位にアラニン (A) を含まないアミノ酸配列によりコードされている。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、切断型カスパーゼ9ポリペプチドは、GFGDVGAL E S L R G N A D L A Y I S L M E P C G H C L I I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A Q Q D H G A L D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S

PEDESPGSPNPEPDATPFQEGRLRTFDQLDAISSSLPTPSDIF
VSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQS
LLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS (配列番号27)
を含むアミノ酸、またはTTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTC
TGCAGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACATCCTGAGCATGGA
ACCCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGAACCTTC
TGCAGAGGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATA
TTGACTGTGAGAAAGCTGCGGAGAAAGGTCTCTAGTCTGCA
CTTTATGGTTCGAAGTGAAAGGGGATCTGACCGCCAAAGAAA
ATGGTGCTGGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATG
GAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCTGATCCTGTCCCACGG
GTGCCAGGCTTCTCATCTGCA GTTCCCCGGAGCAGTGTA
GGAACAGACGGCTGTCTCTGTCAGCGTTGGAGAAAGATCGTCA
ACATCTTCAACGGCACCTTCTTTGCCCTAGTCTGGGGGGGAAA
GCCAAAACCTGTCTTTATCCAGGCCCTGTGGCGGGGGAACAG
AAAGATCACGGCTTCGAGGTGGCCAGCACCCAGCCCTGAGG
ACGAATCACCCAGGGAGCAACCCCTGAACCCAGATGCAACTCC
ATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCT
ATCTCAAGCCTGCCCACTCCTAGTGACATTTTCTGTGTCTT
ACAGTACCTTCCCAGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAA
GTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGACATCTTT
GAACAGTGGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAAGAGCCTGCTGC
TGCAGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAA
ACAGATGCCCGGGTGCTTCAATTTTCTGAGAAAGAAACTG
TTCTTTTAAGACTTCC (配列番号28)を含む核酸配列によりコードされてい
る。

【0038】

切断型カスパーゼ9ポリペプチドを含む、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのあ
る特定の実施形態では、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは、GVQVETIS
PGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDS SRDRNKP FKF
MLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGHPG
IIPPHATLVFDVELL KLEGGGGSGFGDVGAL ESLRGNAD
LAYISLMEPCGHCL IINN VNF CRE SGLRTRTGSNI DCEKL
RRRFSSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCC
VVVILSHGCQASHLQFPGA VYGT DGC PVSVEKIVNIFNGT
SCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGF EVA STSPEDESPGS
NPEPDATPFQEGRLRTFDQLDAISSSLPTPSDIFVSYSTFP
GFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVAN
AVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS (配列番号29)を含むアミノ酸
配列、またはGGGGTCCAGGTGCGAGACTATTTCCACCAGGGGATG
GGCGAACATTTCCAAAAAGGGGCCAGACTTGCCTCGTGCA
TTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTGGAACAGC
TCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTTCATGCTGGGAA
AGCAGGAAGTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCCTGGCACAA
GATGTCAGTCGGCCAGCGGGCCAAACTGACCATTAGCCCT
GACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATCATTC
CCCCCTCATGCCACCCCTGGTCTTTCGATGTGGAACTGCTGAA
GCTGGAGGGAGGAGGAGGATCCGAATTTGGGGACGTGGGG
GCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACA
TCCTGAGCATGGAACCCCTGCGGCCCACTGTCTGATCATTA

C A A T G T G A A C T T T C T G C A G A G A A A G C G G A C T G C G A A C A C G G
A C T G G C T C C A A T A T T G A C T G T G A G A A G C T G C G G A G A A G G T
T C T C T A G T C T G C A C T T T A T G G T C G A A G T G A A A G G G G A T C T
G A C C G C C A A G A A A A T G G T G C T G G C C C T G C T G G A G C T G G C T
C A G C A G G A C C A T G G A G C T C T G G A T T G C T G C G T G G T C G T G A
T C C T G T C C C A C G G G T G C C A G G C T T C T C A T C T G C A G T T C C C
C G G A G C A G T G T A C G G A A C A G A C G G C T G T C C T G T C A G C G T G
G A G A A G A T C G T C A A C A T C T T C A A C G G C A C T T C T T G C C C T A
G T C T G G G G G A A A G C C A A A A C T G T T C T T T A T C C A G G C C T G
T G G C G G G G A A C A G A A A G A T C A C G G C T T C G A G G T G G C C A G C
A C C A G C C C T G A G G A C G A A T C A C C A G G G A G C A A C C C T G A A C
C A G A T G C A A C T C C A T T C C A G G A G G G A C T G A G G A C C T T T G A
C C A G C T G G A T G C T A T C T C A A G C C T G C C C A C T C C T A G T G A C
A T T T T C G T G T C T T A C A G T A C C T T C C C A G G C T T T G T C T C A T
G G C G C G A T C C C A A G T C A G G G A G C T G G T A C G T G G A G A C A C T
G G A C G A C A T C T T T G A A C A G T G G G C C C A T T C A G A G G A C C T G
C A G A G C C T G C T G C T G C G A G T G G C A A A C G C T G T C T C T G T G A
A G G G C A T C T A C A A A C A G A T G C C C G G G T G C T T C A A T T T T C T
G A G A A A G A A A C T G T T C T T T A A G A C T T C C (配列番号30)を含む核
酸配列によりコードされている。

10

20

【0039】

本開示のウイルスベクターは、少なくとも1つの自己切断ペプチドを含んでもよい。一
部の実施形態では、ベクターは、少なくとも1つの自己切断ペプチドを含んでもよく、自
己切断ペプチドは、CARと選択遺伝子の間に位置する。一部の実施形態では、ベクター
は、少なくとも1つの自己切断ペプチドを含んでもよく、第1の自己切断ペプチドは、C
ARの上流に位置し、第2の自己切断ペプチドは、CARの下流に位置する。本開示のウ
イルスベクターは、例えば、本開示のタンパク質足場、C e n t y r i nまたはC A R T
y r i nのうちの1つまたは複数と本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドとの
間に位置する、少なくとも1つの自己切断ペプチドを含んでもよい。本開示のウイルスベ
クターは、少なくとも2つの自己切断ペプチド、例えば本開示の誘導性アポトーシス促進
性ポリペプチドの上流または直ぐ上流に位置する、第1の自己切断ペプチド、および例え
ば本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの下流または直ぐ上流に位置する、第
2の自己切断ペプチドを含んでもよい。自己切断ペプチドは、例えば、T2Aペプチド、
G S G - T 2 Aペプチド、E2Aペプチド、G S G - E 2 Aペプチド、F2Aペプチド、
G S G - F 2 Aペプチド、P2Aペプチド、またはG S G - P 2 Aペプチドを含んでもよ
い。T2Aペプチドは、E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号31)を含む
アミノ酸配列を含んでもよく、またはE G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号
31)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは
99%の同一性を有する配列を含んでもよい。G S G - T 2 Aペプチドは、G S G E G R
G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号32)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、
またはG S G E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号32)を含むアミノ酸配
列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する
配列を含んでもよい。G S G - T 2 Aペプチドは、g g a t c t g g a g a g g g a a g
g g g a a g c c t g c t g a c c t g t g g a g a c g t g g a g g a a a a c c c a
g g a c c a (配列番号33)を含む核酸配列を含んでもよい。E2Aペプチドは、Q C
T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号34)を含むアミノ酸配列を含んでも
よく、またはQ C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号34)を含むアミノ
酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有
する配列を含んでもよい。G S G - E 2 Aペプチドは、G S G Q C T N Y A L L K L A G
D V E S N P G P (配列番号35)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはG S G Q

30

40

50

CTNYALLKL AGDVESNP GP (配列番号35)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。F2Aペプチドは、VKQTLNFDLLKL AGDVESNP GP (配列番号36)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはVKQTLNFDLLKL AGDVE SNP GP (配列番号36)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-F2Aペプチドは、GSGVKQTLNFDLLKL AGDVESNP GP (配列番号37)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはGSGVKQTLNFDLLKL AGDVESNP GP (配列番号37)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。P2Aペプチドは、ATNFSLLKQAGDVEENP GP (配列番号38)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはATNFSLLKQAGDVEENP GP (配列番号38)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-P2Aペプチドは、GSGATNFSLLKQAGDVEENP GP (配列番号39)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはGSGATNFSLLKQAGDVEENP GP (配列番号39)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。

10

【0040】

本開示は、本開示のCARを含むベクターを提供する。ある特定の実施形態では、ベクターは、ナノ粒子である。本開示の例示的なナノ粒子ベクターは、これらに限定されないが、核酸(例えば、RNA、DNA、合成ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、もしくはこれらの任意の組み合わせ)、アミノ酸(L-アミノ酸、D-アミノ酸、合成アミノ酸、修飾アミノ酸、もしくはこれらの任意の組み合わせ)、ポリマー(例えば、ポリマーソーム(polymerosome)、ミセル、脂質(例えば、リボソーム)、有機分子(例えば、炭素原子、シート、繊維、チューブ)、無機分子(例えば、リン酸カルシウムもしくは金)またはこれらの任意の組み合わせを含む。ナノ粒子ベクターは、細胞膜を横切って受動的に輸送されることもあり、または能動的に輸送されることもある。

20

【0041】

本開示のナノ粒子ベクターは、選択遺伝子を含んでもよい。選択遺伝子は、細胞生存度および生存に不可欠な遺伝子産物をコードすることができる。選択遺伝子は、選択的細胞培養条件に負荷されたときの細胞生存度および生存に不可欠な遺伝子産物をコードすることができる。選択的細胞培養条件は、細胞生存度または生存に有害な化合物を含んでもよく、遺伝子産物は化合物に対する耐性を付与する。本開示の例示的な選択遺伝子は、neo(ネオマイシンに対する耐性を付与する)、DHFR(ジヒドロ葉酸レダクターゼをコードし、メトトレキサートに対する耐性を付与する)、TYMS(チミジル酸シンターゼをコードする)、MGMT(O(6)-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼをコードする)、多剤耐性遺伝子(MDR1)、ALDH1(アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリー、メンバーA1をコードする)、FRANCF、RAD51C(RAD51パラログCをコードする)、GCS(グルコシルセラミドシンターゼをコードする)、NKX2.2(NK2ホメオボックス2をコードする)、またはこれらの任意の組み合わせを含むが、それらに限定されない。

30

40

【0042】

本開示のナノ粒子ベクターは、(a)リガンド結合領域と、(b)リンカーと、(c)アポトーシス促進性ポリペプチドとを含む誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドであって、非ヒト配列を含まない誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを含んでもよい。ある特定の実施形態では、非ヒト配列は、制限部位を含む。ある特定の実施形態では、リガンド結合領域は、多量体リガンド結合領域であってもよい。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは、「iC9安全スイッチ」と称されることもある。ある特定の実施形態では、本開示のナノ粒子ベクターは、(a)リガンド結合領域と、(b)リンカーと、

50

(c) カスパーゼポリペプチドとを含む誘導性カスパーゼポリペプチドを含んでもよく、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは非ヒト配列を含まない。ある特定の実施形態では、本開示のナノ粒子ベクターは、(a) リガンド結合領域と、(b) リンカーと、(c) カスパーゼポリペプチドとを含む誘導性カスパーゼポリペプチドを含んでもよく、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは非ヒト配列を含まない。ある特定の実施形態では、本開示のナノ粒子ベクターは、(a) リガンド結合領域と、(b) リンカーと、(c) 切断型カスパーゼ9ポリペプチドとを含む誘導性カスパーゼポリペプチドを含んでもよく、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは非ヒト配列を含まない。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、リガンド結合領域は、FK506結合タンパク質12 (FKBP12) ポリペプチドを含んでもよい。ある特定の実施形態では、FK506結合タンパク質12 (FKBP12) ポリペプチドを含むリガンド結合領域のアミノ酸配列は、該配列の36位に修飾を含んでもよい。修飾は、36位におけるフェニルアラニン(F)からバリン(V)への置換(F36V)であってもよい。ある特定の実施形態では、FKBP12ポリペプチドは、GVQVETISP GDGR TFPKRGQT C V V H Y T G M L E D G K K V D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E (配列番号23)を含むアミノ酸配列によりコードされている。ある特定の実施形態では、FKBP12ポリペプチドは、GGGGTCCAGGTCGAGACTATTT C A C C A G G G G A T G G G C G A A C A T T T C C A A A A A G G G G C C A G A C T T G C G T C G T G C A T T A C A C C G G G A T G C T G G A G G A C G G G A A G A A A G T G G A C A G C T C C A G G G A T C G C A A C A A G C C C T T C A A G T T C A T G C T G G G A A A G C A G G A A G T G A T C C G A G G A T G G G A G G A A G G C G T G G C A C A G A T G T C A G T C G G C C A G C G G G C C A A A C T G A C C A T T A G C C C T G A C T A C G C T T A T G G A G C A A C A G G C C A C C C A G G G A T C A T T C C C C C T C A T G C C A C C C T G G T C T T C G A T G T G G A A C T G C T G A A G C T G G A G (配列番号24)を含む核酸配列によりコードされている。ある特定の実施形態では、36位にフェニルアラニン(F)からバリン(V)への置換(F36V)を有するFK506結合タンパク質12 (FKBP12) ポリペプチドを含んでもよいリガンド結合領域に特異的な誘導剤は、AP20187および/またはAP1903を含み、これらは両方とも合成薬物である。

【0043】

本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、リンカー領域は、GGGGS (配列番号25)を含むアミノ酸またはGGAGGAGGAGGATCC (配列番号26)を含む核酸配列によりコードされている。ある特定の実施形態では、リンカーをコードする核酸配列は、制限部位を含まない。

【0044】

本開示の切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、切断型カスパーゼ9ポリペプチドは、その配列の87位にアルギニン(R)を含まないアミノ酸配列によりコードされている。あるいは、または加えて、本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、切断型カスパーゼ9ポリペプチドは、その配列の282位にアラニン(A)を含まないアミノ酸配列によりコードされている。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性カスパーゼポリペプチドまたは切断型カスパーゼ9ポリペプチドのある特定の実施形態では、切断型カスパーゼ9ポリペプチドは、GFGDVGAL E S L R G N A D L A Y I S L M E P C G H C L I I N N V N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K G D L T A K K M V L A L L E L A Q Q D H G A L D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S

PEDESPGSNPEPDATPFQEGRLRTFDQLDAISSSLPTPSDIF
VSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQS
LLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS (配列番号27)
を含むアミノ酸、またはTTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTC
TGCAGAGGAAATGCCGATCTTGGCTTACATCCTGAGCATGGA
ACCCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGAACCTTC
TGCAGAGGAAAGCGGACTTGCGAACACGGACTTGGCTCCAATA
TTGACTGTGAGAAAGCTTGCAGGAGAAAGGTCTCTAGTCTGCA
CTTTATGGTCTGAAGTGAAAGGGGATCTGACCGCCAAAGAAA
ATGGTGCTGGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATG
GAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCTGATCCTGTCCCACGG
GTGCCAGGCTTCTCATCTTGCAGTTCCCCGGAGCAGTGTAC
GGAACAGACGGCTGTCTCTGTCAGCGTTGGAGAAAGATCGTCA
ACATCTTCAACGGCACCTTCTTGGCCCTAGTCTGGGGGGGAAA
GCCAAAACCTGTCTCTTTATCCAGGCCCTGTGGCGGGGGAACAG
AAAGATCACGGCTTCGAGGTGGCCAGCACCCAGCCCTGAGG
ACGAATCACCCAGGGAGCAACCCCTGAACCCAGATGCAACTCC
ATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCT
ATCTCAAGCCTGCCCACTCCTAGTGACATTTTCTGTGTCTT
ACAGTACCTTCCCAGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAA
GTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGACATCTTT
GAACAGTGGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGC
TGCAGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAA
ACAGATGCCCGGGTGCTTCAATTTTCTGAGAAAGAAACTG
TTCTTTTAAGACTTCC (配列番号28)を含む核酸配列によりコードされてい
る。

【0045】

切断型カスパーゼ9ポリペプチドを含む、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのあ
る特定の実施形態では、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは、GVQVETIS P
GDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDS SRDRNKPFFKFM
LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPG
IIPPHATLVFDVELLKLEGGGGSGFGDVGALLES LRGNAD
LAYISLMEPCGHCLINNPNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL
RRRFSSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCC
VVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVKEIVNIFNGT
SCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDESPGS
NPEPDATPFQEGRLRTFDQLDAISSSLPTPSDIFVSYSTFP
GFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAV
SVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS (配列番号29)を含むアミノ酸
配列、またはGGGGTCCAGGTCTGAGACTATTTCCACCAGGGGATG
GGCGAACATTTCCAAAAAGGGGCCAGACTTGCCTCGTGCA
TTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTGGAACAGC
TCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTTCATGCTGGGAA
AGCAGGAAGTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCCTGGCACAA
GATGTCAGTCGGCCAGCGGGCCAAACTGACCATTAGCCCT
GACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATCATTC
CCCCCTCATGCCACCCCTGGTCTTTCGATGTGGAACTGCTGAA
GCTGGAGGGAGGAGGAGGATCCGAATTTGGGGACGTGGGG
GCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACA
TCCTGAGCATGGAACCCCTGCGGCCCACTGTCTGATCATTA

10

20

30

40

50

C A A T G T G A A C T T T C T G C A G A G A A A G C G G A C T G C G A A C A C G G
 A C T G G C T C C A A T A T T G A C T G T G A G A A G C T G C G G A G A A G G T
 T C T C T A G T C T G C A C T T T A T G G T C G A A G T G A A A G G G G A T C T
 G A C C G C C A A G A A A A T G G T G C T G G C C C T G C T G G A G C T G G C T
 C A G C A G G A C C A T G G A G C T C T G G A T T G C T G C G T G G T C G T G A
 T C C T G T C C C A C G G G T G C C A G G C T T C T C A T C T G C A G T T C C C
 C G G A G C A G T G T A C G G A A C A G A C G G C T G T C C T G T C A G C G T G
 G A G A A G A T C G T C A A C A T C T T C A A C G G C A C T T C T T G C C C T A
 G T C T G G G G G A A A G C C A A A A C T G T T C T T T A T C C A G G C C T G
 T G G C G G G G A A C A G A A A G A T C A C G G C T T C G A G G T G G C C A G C
 A C C A G C C C T G A G G A C G A A T C A C C A G G G A G C A A C C C T G A A C
 C A G A T G C A A C T C C A T T C C A G G A G G G A C T G A G G A C C T T T G A
 C C A G C T G G A T G C T A T C T C A A G C C T G C C C A C T C C T A G T G A C
 A T T T T C G T G T C T T A C A G T A C C T T C C C A G G C T T T G T C T C A T
 G G C G C G A T C C C A A G T C A G G G A G C T G G T A C G T G G A G A C A C T
 G G A C G A C A T C T T T G A A C A G T G G G C C C A T T C A G A G G A C C T G
 C A G A G C C T G C T G C T G C G A G T G G C A A A C G C T G T C T C T G T G A
 A G G G C A T C T A C A A A C A G A T G C C C G G G T G C T T C A A T T T T C T
 G A G A A A G A A A C T G T T C T T T A A G A C T T C C (配列番号30)を含む核
 酸配列によりコードされている。

10

20

【0046】

本開示のナノ粒子ベクターは、少なくとも1つの自己切断ペプチドを含んでもよい。一
 部の実施形態では、ナノ粒子ベクターは、少なくとも1つの自己切断ペプチドを含んでも
 よく、自己切断ペプチドは、CARとナノ粒子の間に位置する。一部の実施形態では、ナ
 ノ粒子ベクターは、少なくとも1つの自己切断ペプチドを含んでもよく、第1の自己切断
 ペプチドは、CARの上流に位置し、第2の自己切断ペプチドは、CARの下流に位置す
 る。一部の実施形態では、ナノ粒子ベクターは、少なくとも1つの自己切断ペプチドを含
 んでもよく、第1の自己切断ペプチドは、CARとナノ粒子の間に位置し、第2の自己切
 断ペプチドは、CARの下流に位置する。一部の実施形態では、ナノ粒子ベクターは、少
 なくとも1つの自己切断ペプチドを含んでもよく、第1の自己切断ペプチドは、CARと
 ナノ粒子の間に位置し、第2の自己切断ペプチドは、CARの下流、例えば、CARと選
 択遺伝子の間に位置する。本開示のナノ粒子ベクターは、例えば、本開示のタンパク質足
 場、CentyrinまたはCARTyrinのうちの1つまたは複数と本開示の誘導性
 アポトーシス促進性ポリペプチドとの間に位置する、少なくとも1つの自己切断ペプチド
 を含んでもよい。本開示のナノ粒子ベクターは、少なくとも2つの自己切断ペプチド、例
 えば本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの上流または直ぐ上流に位置する、
 第1の自己切断ペプチド、および例えば本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド
 の下流または直ぐ上流に位置する、第2の自己切断ペプチドを含んでもよい。自己切断ペ
 プチドは、例えば、T2Aペプチド、GSG-T2Aペプチド、E2Aペプチド、GSG
 -E2Aペプチド、F2Aペプチド、GSG-F2Aペプチド、P2Aペプチド、または
 GSG-P2Aペプチドを含んでもよい。T2Aペプチドは、EGRGSLLTCDVE
 EENPGP (配列番号31)を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはEGRGSL
 LLTCDVEEENPGP (配列番号31)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70
 %、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG
 -T2Aペプチドは、GSGEGRGSLLTCDVEEENPGP (配列番号32)
 を含むアミノ酸配列を含んでもよく、またはGSGEGRGSLLTCDVEEENPG
 P (配列番号32)を含むアミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、90%、9
 5%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでもよい。GSG-T2Aペプチドは、
 ggatctggagagggaagggaaggccctgctgacctgtggag
 acgtggaggaaaaccaggaacca (配列番号33)を含む核酸配列を含

30

40

50

んでもよい。E 2 A ペプチドは、Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 4) を含むアミノ酸配列を含んでもよく、または Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 4) を含むアミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の同一性を有する配列を含んでもよい。G S G - E 2 A ペプチドは、G S G Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 5) を含むアミノ酸配列を含んでもよく、または G S G Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 5) を含むアミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の同一性を有する配列を含んでもよい。F 2 A ペプチドは、V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 6) を含むアミノ酸配列を含んでもよく、または V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 6) を含むアミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の同一性を有する配列を含んでもよい。G S G - F 2 A ペプチドは、G S G V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 7) を含むアミノ酸配列を含んでもよく、または G S G V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 3 7) を含むアミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の同一性を有する配列を含んでもよい。P 2 A ペプチドは、A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号 3 8) を含むアミノ酸配列を含んでもよく、または A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号 3 8) を含むアミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の同一性を有する配列を含んでもよい。G S G - P 2 A ペプチドは、G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号 3 9) を含むアミノ酸配列を含んでもよく、または G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号 3 9) を含むアミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の同一性を有する配列を含んでもよい。

【0047】

本開示は、本開示のベクターを含む組成物を提供する。

【0048】

本開示は、本開示の C A R を含む細胞を提供する。本開示は、本開示のトランスポゾンを含む細胞を提供する。ある特定の実施形態では、本開示の C A R、トランスポゾンまたはベクターを含む細胞は、細胞表面に C A R を発現することができる。細胞は、いずれの型の細胞であってもよい。好ましくは、細胞は、免疫細胞である。免疫細胞は、T細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、ナチュラルキラー (NK) 様細胞 (例えば、サイトカイン誘導キラー (CIK) 細胞)、造血前駆細胞、末梢血 (PB) 由来 T 細胞または臍帯血 (UCB) 由来 T 細胞であってもよい。好ましくは、免疫細胞は、T 細胞である。細胞は、本開示の修飾免疫細胞または T 細胞を刺激および増殖するために任意選択で使用される人工抗原提示細胞であってもよい。細胞は、人工または修飾抗原提示細胞として任意選択で使用される腫瘍細胞であってもよい。

【0049】

養子療法に使用される本開示の修飾細胞は、自己のものまたは同種異系のものであってもよい。

【0050】

本開示は、細胞の表面にキメラ抗原受容体 (C A R) を発現させる方法であって、(a) 細胞集団を得るステップ、(b) 細胞集団を、本開示の C A R を含む組成物または C A R をコードする配列を含む組成物に、細胞集団内の少なくとも 1 つの細胞の細胞膜を横切って C A R を移入させるのに十分な条件下で接触させることによって、修飾された細胞集団を生成するステップ；(c) 修飾された細胞集団を、トランスポゾンの組込みに好適な条件下で、培養するステップ、および (d) 細胞表面に C A R を発現する修飾細胞集団の少なくとも 1 つの細胞を増殖および／または選択するステップを含む方法を提供する。

【0051】

C A R を発現させるこの方法のある特定の実施形態では、細胞集団は、白血球ならびに／または C D 4 + および C D 8 + 白血球を含んでもよい。細胞集団は、C D 4 + 白血球と

CD8+白血球を、最適化された比で含んでもよい。CD4+白血球 対 CD8+白血球の最適化された比は、*in vivo*には天然に存在しない。細胞集団は、腫瘍細胞を含んでもよい。

【0052】

CARを発現させるこの方法のある特定の実施形態では、トランスポゾンまたはベクターは、CARまたはCARをコードする配列を含む。

【0053】

CARを発現させるこの方法のある特定の実施形態では、細胞集団内の少なくとも1つの細胞の細胞膜を横切ってCARをコードする配列を移行させるのに十分な条件はヌクレオフェクション (*nucleofection*) を含む。

【0054】

CARを発現させるこの方法のある特定の実施形態では、細胞集団内の少なくとも1つの細胞の細胞膜を横切ってCARをコードする配列を移行させるのに十分な条件は、指定電圧での1回または複数回の電気パルスの印加、緩衝液、および1つまたは複数のさらなる因子のうちの少なくとも1つを含む。ある特定の実施形態では、緩衝液は、PBS、HBSS、OptiMEM、BTXpress、Amaxa Nucleofector、ヒトT細胞ヌクレオフェクション緩衝液、またはこれらの任意の組み合わせを含んでもよい。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の追加因子は、(a) 組換えヒトサイトカイン、ケモカイン、インターロイキンまたはこれらの任意の組み合わせ、(b) 塩、無機物、代謝物またはこれらの任意の組み合わせ、(c) 細胞培地、(d) 細胞のDNA感知、代謝、分化、シグナル伝達、1つもしくは複数のアポトーシス経路またはこれらの組み合わせの阻害剤、および(e) 1つまたは複数の核酸を修飾または安定化する試薬を含んでもよい。組換えヒトサイトカイン、ケモカイン、インターロイキンまたはこれらの任意の組み合わせは、IL2、IL7、IL12、IL15、IL21、IL1、IL3、IL4、IL5、IL6、IL8、CXCL8、IL9、IL10、IL11、IL13、IL14、IL16、IL17、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL35、IL36、GM-CSF、IFN-ガンマ、IL-1アルファ/IL-1F1、IL-1ベータ/IL-1F2、IL-12 p70、IL-12/IL-35 p35、IL-13、IL-17/IL-17A、IL-17A/Fヘテロ二量体、IL-17F、IL-18/IL-1F4、IL-23、IL-24、IL-32、IL-32ベータ、IL-32ガンマ、IL-33、LAP (TGF-ベータ1)、リンホトキシン-アルファ/TNF-ベータ、TGF-ベータ、TNF-アルファ、TRANCE/TNFSF11/RANK Lまたはこれらの任意の組み合わせを含みうる。塩、無機物、代謝物またはこれらの任意の組み合わせは、HEPES、ニコチンアミド、ヘパリン、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、MEM非必須アミノ酸溶液、アスコルビン酸、ヌクレオシド、FBS/FCS、ヒト血清、代用血清、抗生物質、pH調節剤、アール塩、2-メルカプトエタノール、ヒトトランスフェリン、組換えヒトインスリン、ヒト血清アルブミン、Nucleofector PLUS Supplement、KCL、MgCl₂、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、ラクトビオン酸ナトリウム、マンニトール、コハク酸ナトリウム、塩化ナトリウム、CINa、グルコース、Ca(NO₃)₂、Tris/HCl、K₂HPO₄、KH₂PO₄、ポリエチレンイミン、ポリエチレングリコール、ポロクサマー188、ポロクサマー181、ポロクサマー407、ポリビニルピロリドン、Pop313、クラウン-5、またはこれらの任意の組み合わせを含みうる。細胞培地は、PBS、HBSS、OptiMEM、DMEM、RPMI 1640、AIM-V、X-VIVO 15、CellGro DC培地、CTS Optimizer T Cell Expansion SFM、TexMACS培地、PRIME-XV T Cell Expansion培地、ImmunoCult-XF T Cell Expansion培地またはこれらの任意の組み合わせを含みうる。細胞のDNA感知、代謝、分化、シグナル伝達、1つもしくは複数のアポトーシス経路またはこれら

10

20

30

40

50

の組み合わせの阻害剤は、TLR9、MyD88、IRAK、TRAF6、TRAF3、IRF-7、NF-κB、1型インターフェロン、炎症促進性サイトカイン、cGAS、STING、Sec5、TBK1、IRF-3、RNA pol III、RIG-1、IPS-1、FADD、RIP1、TRAF3、AIM2、ASC、カスパーゼ1、Pro-IL1β、PI3K、Akt、Wnt3Aの阻害剤、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3β (GSK-3β)の阻害剤 (例えば、TWS119)、バフィロマイシン、クロロキン、キナクリン、AC-YVAD-CMK、Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMKまたはこれらの任意の組み合わせを含む。1つまたは複数の核酸を修飾または安定化する試薬は、pH調整剤、DNA結合タンパク質、脂質、リン脂質、CaPO₄、NLS配列を有するもしくは有さない正味中性電荷DNA結合ペプチド、TREX1酵素、またはこれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0055】

CARを発現させるこの方法のある特定の実施形態では、本開示のCARまたはCARをコードする配列の組込みに好適な条件は、緩衝液および1つまたは複数のさらなる因子のうちの少なくとも1つを含む。ある特定の実施形態では、本開示のトランスポゾンまたはベクターは、本開示のCARまたはCARをコードする配列を含む。ある特定の実施形態では、緩衝液は、PBS、HBSS、OptiMEM、BTXpress、Amaxa

Nucleofector、ヒトT細胞ヌクレオフェクション緩衝液、またはこれらの任意の組み合わせを含んでもよい。ある特定の実施形態では、1つまたは複数の追加因子は、(a) 組換えヒトサイトカイン、ケモカイン、インターロイキンまたはこれらの任意の組み合わせ、(b) 塩、無機物、代謝物またはこれらの任意の組み合わせ、(c) 細胞培地、(d) 細胞のDNA感知、代謝、分化、シグナル伝達、1つもしくは複数のアポトーシス経路またはこれらの組み合わせの阻害剤、および(e) 1つまたは複数の核酸を修飾または安定化する試薬を含んでもよい。組換えヒトサイトカイン、ケモカイン、インターロイキンまたはこれらの任意の組み合わせは、IL2、IL7、IL12、IL15、IL21、IL1、IL3、IL4、IL5、IL6、IL8、CXCL8、IL9、IL10、IL11、IL13、IL14、IL16、IL17、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL35、IL36、GM-CSF、IFN-γ、IL-1α/IL-1F1、IL-1β/IL-1F2、IL-12

20

30

p70、IL-12/IL-35 p35、IL-13、IL-17/IL-17A、IL-17A/Fヘテロ二量体、IL-17F、IL-18/IL-1F4、IL-23、IL-24、IL-32、IL-32β、IL-32γ、IL-33、LAP (TGFB-β1)、リンホトキシン-α/ TNF-β、TGFB-β、TNF-α、TRANCE/TNFSF11/RANK Lまたはこれらの任意の組み合わせを含んでもよい。塩、無機物、代謝物またはこれらの任意の組み合わせは、HEPES、ニコチンアミド、ヘパリン、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、MEM非必須アミノ酸溶液、アスコルビン酸、ヌクレオシド、FBS/FCS、ヒト血清、代用血清、抗生物質、pH調節剤、アール塩、2-メルカプトエタノール、ヒトトランスフェリン、組換えヒトインスリン、ヒト血清アルブミン、Nucleofector PLUS Supplement、KCL、MgCl₂、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、ラクチオン酸ナトリウム、マンニトール (Mannitol)、コハク酸ナトリウム、塩化ナトリウム、CINa、グルコース、Ca(NO₃)₂、Tris/HCl、K₂HPO₄、KH₂PO₄、ポリエチレンジオキシエチレン、ポリエチレングリコール、ボロクサマー188、ボロクサマー181、ボロクサマー407、ポリビニルピロリドン、Pop313、クラウン-5、またはこれらの任意の組み合わせを含んでもよい。細胞培地は、PBS、HBSS、OptiMEM、DMEM、RPMI 1640、AIM-V、X-VIVO 15、CellGro DC培地、CTS OptiMax T Cell Expansion SFM、TexMACS培地、PRIME-XV T Cell Expansion培地、ImmunoCult-XF T Cell Expansion培

40

50

地またはこれらの任意の組み合わせを含んでもよい。細胞のDNA感知、代謝、分化、シグナル伝達、1つもしくは複数のアポトーシス経路またはこれらの組み合わせの阻害剤は、TLR9、MyD88、IRAK、TRAF6、TRAF3、IRF-7、NF-κB、1型インターフェロン、炎症促進性サイトカイン、cGAS、STING、Sec5、TBK1、IRF-3、RNA pol I II、RIG-1、IPS-1、FADD、RIP1、TRAF3、AIM2、ASC、カスパーゼ1、Pro-IL1β、PI3K、Akt、Wnt3Aの阻害剤、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3β (GSK-3β)の阻害剤(例えば、TWS119)、バフィロマイシン、クロロキン、キナクリン、AC-YVAD-CMK、Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMKまたはこれらの任意の組み合わせを含む。1つまたは複数の核酸を修飾または安定化する試薬は、pH調整剤、DNA結合タンパク質、脂質、リン脂質、CaPO₄、NLS配列を有するもしくは有さない正味中性電荷DNA結合ペプチド、TREX1酵素、またはこれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0056】

CARを発現させるこの方法のある特定の実施形態では、増殖および選択ステップは、逐次的に行われる。増殖を選択の前に行ってもよい。増殖を選択の後に行ってもよく、任意選択で、さらなる(すなわち、第2の)選択を増殖後に行ってもよい。

【0057】

CARを発現させるこの方法のある特定の実施形態では、増殖および選択ステップを同時に行ってもよい。

20

【0058】

CARを発現させるこの方法のある特定の実施形態では、増殖は、修飾細胞集団の少なくとも1つの細胞を抗原と接触させてその少なくとも1つの細胞をCARにより刺激することによって、増殖された細胞集団を生成することを含みうる。抗原を支持体(substrate)の表面に提示させてもよい。支持体は、これらに限定されないが、表面、ウェル、1個もしくは複数のビーズ、およびマトリクスを含む、いずれの形態を有してもよい。支持体は、常磁性または磁性成分をさらに含んでもよい。CARを発現させるこの方法のある特定の実施形態では、磁性ビーズである支持体の表面に抗原を提示させることもあり、その場合、磁石を使用して、磁性ビーズを、修飾および増殖された細胞集団から除去または分離することができる。抗原を細胞または人工抗原提示細胞の表面に提示させてもよい。本開示の人工抗原提示細胞は、腫瘍細胞および幹細胞を含むことができるが、これらに限定されない。

30

【0059】

CARを発現させるこの方法のある特定の実施形態では、トランスポゾンまたはベクターは、選択遺伝子を含み、この場合の選択ステップは、修飾細胞集団の少なくとも1つの細胞を化合物(選択遺伝子は、この化合物に対する耐性を付与するものである)と接触させることによって、選択遺伝子を発現する細胞を、選択を生き抜くものとして同定し、選択遺伝子を発現することができない細胞を、選択ステップを生き抜くことができないものとして同定することを含む。

【0060】

CARを発現させるこの方法のある特定の実施形態では、増殖および/または選択ステップは、10~14日(端点を含む)の期間、実施してもよい。

40

【0061】

本開示は、本開示の方法の、修飾、増殖および選択された細胞集団を含む組成物を提供する。

【0062】

本開示は、それを必要とする被験体におけるがんを処置する方法を提供し、この方法は、被験体に本開示の組成物を投与するステップを含み、ここでCARは腫瘍細胞上の抗原に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、腫瘍細胞は、悪性腫瘍細胞であり得る。本開示の修飾細胞または細胞集団を含む組成物を被験体に投与するステップを含む、ある

50

特定の実施形態では、細胞または細胞集団は、自己のものであってもよい。被験体に、本開示の修飾細胞または細胞集団を含む組成物を投与するステップを含む、ある特定の実施形態では、細胞または細胞集団は、同種異系のものであってもよい。

【0063】

本開示は、それを必要とする被験体の自己免疫状態を処置する方法であって、被験体に本開示の組成物を投与するステップを含み、CARが被験体の自己免疫細胞上の抗原に特異的に結合する、方法を提供する。ある特定の実施形態では、自己免疫細胞は被験体の標的細胞上の自己抗原に特異的に結合するリンパ球であってもよい。ある特定の実施形態では、自己免疫細胞はBリンパ球（すなわち、B細胞）であってもよい。ある特定の実施形態では、自己免疫細胞はTリンパ球（すなわち、T細胞）であってもよい。被験体に本開示の修飾細胞または細胞集団を含む組成物を投与するステップを含む、ある特定の実施形態では、細胞または細胞集団は自己のものであってもよい。被験体に本開示の修飾細胞または細胞集団を含む組成物を投与するステップを含む、ある特定の実施形態では、細胞または細胞集団は同種異系のものであってもよい。

【0064】

本開示は、それを必要とする被験体における感染を処置する方法であって、被験体に本開示の組成物を投与するステップを含み、CARが、感染因子を含む細胞、感染因子に感染した（in communication with）細胞、または感染因子に曝露された細胞上の抗原に特異的に結合する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、感染因子に感染した細胞は、感染因子に空気伝染（例えば、感染因子が空気に媒介されるまたは吸入される）または流体伝染（例えば、感染因子が水または生体液（biological fluid）で運搬される）し得る。宿主細胞の感染を引き起こす感染因子は、細菌、ウイルス、酵母または微生物でありうる。感染因子は、細胞または細胞の宿主生物（被験体）において、これらに限定されないが、ウイルス感染、免疫不全状態、炎症状態および増殖性障害を含む、例示的な状態を誘導しうる。ある特定の実施形態では、感染は、結核、小頭症、神経変性またはマラリアを引き起こす。ある特定の実施形態では、感染は、被験体の胎児で小頭症を引き起こす。感染が被験体の胎児で小頭症を引き起こすものを含む、ある特定の実施形態では、感染因子はウイルスであり、ウイルスはジカウイルスである。ある特定の実施形態では、免疫不全状態は後天性免疫不全症候群（AIDS）である。ある特定の実施形態では、増殖性障害はがんである。ある特定の実施形態では、がんは子宮頸がんであり、感染因子はヒトパピローマウイルス（HPV）である。被験体に本開示の修飾細胞または細胞集団を含む組成物を投与するステップを含む、ある特定の実施形態では、細胞または細胞集団は自己のものであってもよい。被験体に本開示の修飾細胞または細胞集団を含む組成物を投与するステップを含む、ある特定の実施形態では、細胞または細胞集団は同種異系のものであってもよい。

【0065】

本開示は、それを必要とする被験体における肥満細胞疾患を処置する方法であって、被験体に本開示の組成物を投与するステップを含み、CARが肥満細胞上の抗原に特異的に結合する、方法を提供する。ある特定の実施形態では、CARは被験体の肥満細胞上の抗原に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、肥満細胞疾患は、これらに限定されないが、肥満細胞の過剰な増殖と関連する障害、異常な活性を有する肥満細胞と関連する障害、および異常な数の肥満細胞と異常な肥満細胞活性の両方と関連する障害を含む。肥満細胞の過剰な増殖と関連する例示的な障害は、これらに限定されないが、肥満細胞症、皮膚肥満細胞症（例えば、色素性蕁麻疹（urticaria pigmentosa）または斑丘疹皮膚肥満細胞症（maculopapular cutaneous mastocytosis））、全身性肥満細胞症（肥満細胞性白血病を含む）、および局所的肥満細胞増殖を含む。異常な活性を有する肥満細胞と関連する例示的な障害は、これらに限定されないが、肥満細胞活性化症候群（MCAS）または肥満細胞活性化障害（MCAD）、アレルギー疾患（アナフィラキシーを含む）、喘息、炎症性疾患（例えば、関節組織の自己免疫関連炎症、関節炎などを含む）、またはこれらの任意の組み合わせを含む。被験体に本開示の修飾細胞または細胞集団を含む組成物を

投与するステップを含む、ある特定の実施形態では、細胞または細胞集団は自己のものであってもよい。被験体に本開示の修飾細胞または細胞集団を含む組成物を投与するステップを含む、ある特定の実施形態では、細胞または細胞集団は同種異系のものであってもよい。本開示は、それを必要とする被験体における変性疾患を処置する方法であって、被験体に本開示の組成物を被験体に投与するステップを含み、CARが有害な細胞または老化細胞上の抗原に特異的に結合する、方法を提供する。ある特定の実施形態では、CARは被験体の有害な細胞または老化細胞上の抗原に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、変性疾患としては、これらに限定されないが、神経変性障害、代謝障害、血管障害および老化を含みうる。例示的な神経変性障害は、これらに限定されないが、ニューロン、グリア細胞またはミクログリアの1つまたは複数の機能または有効性の喪失と関連する障害を含む。例示的な神経変性障害は、これらに限定されないが、ニューロン、グリア細胞またはミクログリアの1つまたは複数の機能に干渉するかまたはその有効性を減少させるシグナル伝達分子、タンパク質またはプリオンの1つまたは複数の蓄積と関連する障害を含む。例示的な代謝障害は、これらに限定されないが、ミトコンドリア障害、電子伝達系の妨害、ATPの細胞生産の妨害、ニューロン、グリア細胞またはミクログリアのうちの1つまたは複数における、1つまたは複数のミトコンドリアの機能の喪失またはその有効性の減少と関連する障害を含む。例示的な代謝障害は、これらに限定されないが、循環血流の喪失またはニューロン、グリア細胞もしくはミクログリアへの血流の減少（例えば脳卒中）；ニューロン、グリア細胞またはミクログリアの一過的または永続的な低酸素状態（例えば、細胞におけるフリーラジカルの放出に十分な）；睡眠状態中にニューロン、グリア細胞またはミクログリアの老廃物の除去の有効性を減少させるのに十分な、被験体の睡眠状態中の循環CNSの喪失またはニューロン、グリア細胞もしくはミクログリアへのCNS流の減少と関連する障害を含む。例示的な老化障害は、これらに限定されないが、ニューロン、グリア細胞またはミクログリアの1つまたは複数の染色体の短縮の増加または短縮テロメア；ニューロン、グリア細胞またはミクログリアのテロメラーゼの機能の喪失またはその有効性の減少；またはニューロン、グリア細胞またはミクログリアのDNA修復メカニズムの機能の喪失またはその有効性の減少と関連する障害を含む。ある特定の実施形態では、有害な細胞または老化細胞は、有害な細胞または老化細胞を含むネットワークの別の細胞の機能に干渉するかまたはその有効性を減少させ、有害な細胞または老化細胞の標的化された除去が、ネットワークの機能を改善または回復し、有効性を増加させる。ある特定の実施形態では、有害な細胞または老化細胞は、第二の細胞の機能または有効性を転換することができ、有害な細胞または老化細胞の標的化された除去は第二の細胞の形質転換を妨げる。ある特定の実施形態では、変性疾患は神経変性障害であり、有害な細胞または老化細胞は幹細胞、免疫細胞、ニューロン、グリアまたはミクログリアである。ある特定の実施形態では、変性疾患は代謝障害であり、有害な細胞または老化細胞は幹細胞、体細胞、ニューロン、グリアまたはミクログリアである。ある特定の実施形態では、変性疾患は血管障害であり、有害な細胞または老化細胞は幹細胞、体細胞、免疫細胞、内皮細胞、ニューロン、グリアまたはミクログリアである。ある特定の実施形態では、変性疾患は老化であり、有害な細胞または老化細胞は卵母細胞、精子、幹細胞、体細胞、免疫細胞、内皮細胞、ニューロン、グリアまたはミクログリアである。本開示の修飾細胞または細胞集団を含む組成物を被験体に投与するステップを含むある特定の実施形態では、細胞または細胞集団は自己のものであってもよい。本開示の修飾細胞または細胞集団を含む組成物を被験体に投与するステップを含むある特定の実施形態では、細胞または細胞集団は同種異系のものであってもよい。

【0066】

本開示は、それを必要とする被験体における細胞療法を改変する方法であって、被験体に、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを含む組成物のトランスポゾンまたはベクターを含む細胞を含む組成物を投与するステップを含み、細胞と誘導剤を接触させることにより細胞においてアポトーシスを選択的に誘導することができる、方法を提供する。ある特定の実施形態では、細胞は、自己のものである。ある特定の実施形態では、細胞は、同

10

20

30

40

50

種異系のものである。この方法のある特定の実施形態では、細胞療法は、養子細胞療法である。この方法のある特定の実施形態では、細胞療法の改変は、細胞療法の終了を含む。この方法のある特定の実施形態では、細胞療法の改変は、細胞療法に提供される細胞の一部分の枯渇を含む。ある特定の実施形態では、方法は、細胞療法の改変を阻害するために誘導剤の阻害剤を投与するステップをさらに含み、それによって細胞療法の機能および／または有効性を回復させる。

【0067】

本開示の細胞療法を改変する方法を使用して、例えば、回復の徴候、または疾患の重症度／進行を減少させる徴候、疾患寛解／停止の徴候、および／または有害事象の発生に応じて、療法を終了させるまたは減弱することができる。疾患の徴候もしくは症状が再出現する、もしくは重症度において増加する、かつ／または有害事象が解消されれば、誘導剤を阻害することにより本開示の細胞療法を再開することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】図1は、CARTyrinを含むトランスポゾンを含む7676塩基対の本開示のpiggyBac-CARTyrin構築物（CD8aシグナルペプチド、Centyrin、CD8aヒンジ配列、および膜貫通配列、ならびにCD3ζ共刺激ドメインを含む）を示す模式図である。

【0069】

【図2】図2は、本開示のP-BCMA-101構築物のアミノ酸配列の模式図である。

20

【0070】

【図3A】図3A～Bは、本開示のP-BCMA-101構築物の核酸配列の模式図である。

【図3B】同上。

【0071】

【図4】図4は、本開示のCARTyrinの構築を示す模式図ならびにCentyrinおよび抗体の特徴を対比する表である。

【0072】

【図5A】図5Aは、5μgのCARTyrin mRNAによるエレクトロポレーション後のCARTyrin発現を示す、一連の細胞ソーティングプロットである。

30

【0073】

【図5B】図5Bの左のパネルは、対照のK562細胞株およびBCMA発現H929細胞株によるチャレンジ後のCARTyrin機能を示す一連の細胞ソーティングプロットであり、右のパネルは、左のパネルのプロットの定量を示すグラフである（BCMA発現株U266によるチャレンジのデータを加えた）。

【0074】

【図5C】図5Cは、T細胞のエレクトロポレーション中に使用したmRNAの量の関数としてCARTyrin活性を示すグラフである。

【0075】

【図6】図6は、マウスのA08-CARTyrinを使用するin vivo腫瘍チャレンジ研究のタイムラインを示す模式図である。

40

【0076】

【図7】図7は、A08-CARTyrin処置マウスの完全な（100%）生存を示す対のグラフである。腫瘍量は、M-タンパク質の存在によって評価された。保護された動物ではM-タンパク質は検出不能だった。

【0077】

【図8】図8は、本開示の例示的な誘導性切断型カスパーゼ9ポリペプチドを示す模式図である。

【0078】

【図9】図9は、ヌクレオフェクション後12日目の、単独での治療剤（CARTyrin

50

n)を発現するように修飾された細胞、または本開示の誘導性カスパーゼポリペプチド (p i g g y B a c (P B) トランスポザーゼにより細胞に導入された i C 9 構築物 (「安全スイッチ」としても公知)によりコードされている)と併せて C A R T y r i n を発現するように修飾された細胞における、生細胞のエリア (ゲートされた右下象限) からアポトーシス細胞により占有されたエリア (左上象限) に移動する細胞の存在量を、誘導剤 (A P 1 9 0 3) の漸増投薬量の関数として示す、一連のフローサイトメトリープロットである。

【0079】

【図10】図10は、ヌクレオフェクション後19日目の、単独で治療剤 (C A R T y r i n) を発現するように修飾された細胞、または本開示の誘導性カスパーゼポリペプチド (p i g g y B a c (P B) トランスポザーゼにより細胞に導入された i C 9 構築物 (「安全スイッチ」としても公知)によりコードされている)と併せて C A R T y r i n を発現するように修飾された細胞における、生細胞のエリア (ゲートされた右下象限) からアポトーシス細胞により占有されたエリア (左上象限) に移動する細胞の存在量を、誘導剤 (A P 1 9 0 3) の漸増投薬量の関数として示す、一連のフローサイトメトリープロットである。

10

【0080】

【図11】図11は、図9 (左のグラフ) または図10 (右のグラフ) のいずれかに示されている凝集結果の定量を示す1対のグラフである。具体的には、これらのグラフは、12日目 (図9および左のグラフ) または19日目 (図10および右のグラフ) のいずれかにおける細胞生存パーセントに対する i C 9 安全スイッチの影響を、各々の修飾された細胞型について i C 9 スwitchの誘導剤 (A P 1 9 0 3) の濃度の関数として示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0081】

本開示は、少なくとも1つの C e n t y r i n を含むキメラ抗原受容体を提供する。本開示のキメラ抗原受容体は、1つより多くの C e n t y r i n を含んでもよい。例えば、二重特異性 C A R は、2つの異なる抗原に特異的に結合する2つの C e n t y r i n を含む。

【0082】

本開示の C e n t y r i n は抗原に特異的に結合する。抗原に特異的に結合する1つまたは複数の C e n t y r i n を含む本開示のキメラ抗原受容体を使用して、細胞 (例えば、細胞傷害性免疫細胞) の特異性を特異的抗原へ指向させることができる。

30

【0083】

本開示の C e n t y r i n は、L P A P K N L V V S E V T E D S L R L S W T A P D A A F D S F L I Q Y Q E S E K V G E A I N L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V K G G H R S N P L S A E F T T (配列番号1) を含むコンセンサス配列を含んでもよい。

【0084】

本開示のキメラ抗原受容体は、ヒト C D 2、C D 3 δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、C D 3 ζ 、C D 4、C D 8 α 、C D 1 9、C D 2 8、4-1 B B または G M - C S F R のシグナルペプチドを含んでもよい。本開示のヒンジ/スパーサードメインは、ヒト C D 8 α 、I g G 4、および/または C D 4 のヒンジ/スパーサー/ストーク (stalk) を含んでもよい。本開示の細胞内ドメインまたはエンドドメインは、ヒト C D 3 ζ の細胞内シグナル伝達ドメインを含むことがあり、ヒト 4-1 B B、C D 2 8、C D 4 0、I C O S、M y D 8 8、O X - 4 0 細胞内セグメント、またはこれらの任意の組み合わせをさらに含んでもよい。例示的な膜貫通ドメインは、これらに限定されないが、ヒト C D 2、C D 3 δ 、C D 3 ϵ 、C D 3 γ 、C D 3 ζ 、C D 4、C D 8 α 、C D 1 9、C D 2 8、4-1 B B または G M - C S F R 膜貫通ドメインを含む。

40

【0085】

本開示は、例えば、T細胞、NK細胞、造血前駆細胞、末梢血 (P B) 由来T細胞 (G

50

ー C S F 動員末梢血からの T 細胞を含む)、臍帯血 (U C B) 由来 T 細胞などの、遺伝子修飾細胞であって、これらの細胞に本開示の C A R および／または C A R T y r i n を導入することにより 1 つまたは複数の抗原に対して特異的であるようにされた、遺伝子修飾細胞を提供する。本開示の細胞は、本開示の C A R または C A R T y r i n をコードするトランスポゾン、および本開示のトランスポザーゼをコードする配列 (好ましくは、本開示のトランスポザーゼをコードする配列は m R N A 配列である) を含むプラスミドの電気移入 (e l e c t r o t r a n s f e r) により、修飾することができる。

【0086】

組換え／修飾細胞のエピソームに維持されているまたはゲノムに組み込まれている、本開示のトランスポゾン。トランスポゾンは、非ウイルス遺伝子移入増進のためにトランス
10
ポゾンおよびトランスポザーゼを利用する 2 成分 p i g g y B a c システムの一部であってもよい。この方法のある特定の実施形態では、トランスポゾンはキメラ抗原受容体をコードする配列が 2 つのシス調節性インスレーターエレメントによって挟まれている、プラスミド DNA トランスポゾンである。ある特定の実施形態では、トランスポゾンは、p i g g y B a c トランスポゾンである。ある特定の実施形態では、特に、トランスポゾンが p i g g y B a c トランスポゾンである実施形態では、トランスポザーゼは p i g g y B a c (商標) または S u p e r p i g g y B a c (商標) (S P B) トランスポザーゼである。

【0087】

本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポゾンは、抗原受容体をコードする
20
配列が 2 つのシス調節性インスレーターエレメントに挟まれている、プラスミド DNA トランスポゾンである。ある特定の実施形態では、トランスポゾンは p i g g y B a c トランスポゾンである。ある特定の実施形態では、特に、トランスポゾンが p i g g y B a c トランスポゾンである実施形態では、トランスポザーゼは、p i g g y B a c (商標) または S u p e r p i g g y B a c (商標) (S P B) トランスポザーゼである。ある特定の実施形態では、特に、トランスポザーゼが S u p e r p i g g y B a c (商標) (S P B) トランスポザーゼである実施形態では、トランスポザーゼをコードする配列は、m R N A 配列である。

【0088】

本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、p i g g y B a c
30
(商標) (P B) トランスポザーゼ酵素である。p i g g y B a c (P B) トランスポザーゼ酵素は、下記のものと少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、99% またはこれらの間の任意の百分率において同一のアミノ酸配列を含んでもよい、またはそれからなってもよい：

【化 5】

```

1  MGSSLDDEHI LSALLQSDDE LVGEDSDSEI SDHVSDDVQ SDTEEFIDE VHEVQPTSSG
61  SEILDEQNV I EQPGSSLASN RILTLPQRTI RGKNKHCWST SKSTRRSRVS ALNIVRSQRG
121 PTRMCRNIYD PLLCFKLFFT DEIISEIVKW TNAEISLKRR ESMTGATFRD TNEDEIYAFF
181 GILVMTAVRK DNHMSTDDLF DRSLSMVYVS VMSRDRFDFL IRCLRMDDKS IRPTLRENDV
241 FTPVRKIWDL FIHQCIQNYT PGAHLTIDEQ LLGFRGRCPF RMYIPNKPSK YGIKILMMCD
301 SGYKYMINGM PYLGRGTQTN GVPLGEYYVK ELSKPVHGSC RNITCDNWFT SIPLAKNLLQ
361 EPYKLTI VGT VRSNKREIPE VLKNSRSRPV GTSMFCFDGP LTLVSYKPKP AKMVYLLSSC
421 DEDASINEST GKPQMVMYYN QTKGGVD TLD QMCSVMTC SR KTNRPWPMALL YGMINIACIN
481 SFIIYSHNVS SKGEKVQSRK KFM RNLYMSL TSSFMKRLE APTLKRYLRD NISNILPNEV
541 PGTSDDSTEE PVMKKRTYCT YCPSKIRRKA NASCKKCKKV ICREHNIDMC QSCF (配列番号
12).
```

【0089】

本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、下記の配列の 30、165、282 もしくは 538 位のうちの 1 つもしくは複数にアミノ酸置換を有するア
50

ミノ酸配列を含む、またはそれからなる、p i g g y B a c（商標）（P B）トランスポザラーゼ酵素である：

【化 6】

```

1 MGSSLDDEHI LSALLQSDDE LVGEDSDSEI SDHVSDDVQ SDTEEFIDE VHEVQPTSSG
61 SEILDEQNVI EQPGSSLASN RILTLPQRTI RGKNKHCWST SKSTRRSRVS ALNIVRSQRG
121 PTRMCRNIYD PLLCFKLFFT DEIISEIVKW TNAEISLKRR ESMTGATFRD TNEDEIYAFF
181 GILVMTAVRK DNHMSTDDL F DRSLSMVYVS VMSRDRFDL IRCLRMDDKS IRPTLRENDV
241 FTPVRKIWDL FIHQCIQNYT PGAHLTIDEQ LLGFRGRCPF RMYIPNKPSK YGIKILMMCD
301 SGYKYMINGM PYLGRGTQTN GVPLGEYYVK ELSKPVHGSC RNITCDNWFT SIPLAKNLLQ
361 EPYKLITIVGT VRSNKREIPE VLKNSRSRPV GTSMFCDGDP LTLVSYKPKP AKMVYLLSSC
421 DEDASINEST GKPQVMYYN QTKGGVDTLD QMCSVMTCSR KTNRWPMALL YGMINIACIN
481 SFIIYSHNVS SKGEKVQSRK KFMRLNLYMSL TSSFMRKRLE APTLKRYLRD NISNILPNEV
541 PGTSDDSTEE PVMKKRTYCT YCPSKIRKKA NASCKKCKKV ICREHNIDMC QSCF (配列番号
12).
```

10

【0090】

ある特定の実施形態では、トランスポザラーゼ酵素は、配列番号12の配列の30、165、282もしくは538位のうちの2つもしくはそれより多くにアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、p i g g y B a c（商標）（P B）トランスポザラーゼ酵素である。ある特定の実施形態では、トランスポザラーゼ酵素は、配列番号12の配列の30、165、282もしくは538位のうちの3つもしくはそれより多くにアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、p i g g y B a c（商標）（P B）トランスポザラーゼ酵素である。ある特定の実施形態では、トランスポザラーゼ酵素は、配列番号12の配列の以下の30、165、282および538位の各々にアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、またはそれからなる、p i g g y B a c（商標）（P B）トランスポザラーゼ酵素である。ある特定の実施形態では、配列番号12の配列の30位におけるアミノ酸置換は、イソロイシン（I）からバリン（V）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12の配列の165位におけるアミノ酸置換は、グリシン（G）からセリン（S）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12の配列の282位におけるアミノ酸置換は、メチオニン（M）からバリン（V）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12の配列の538位におけるアミノ酸置換は、アスパラギン（N）からリシン（K）への置換である。

20

30

【0091】

本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポザラーゼ酵素は、Super p i g g y B a c（商標）（s P B o）トランスポザラーゼ酵素である。ある特定の実施形態では、本開示のSuper p i g g y B a c（商標）（s P B o）トランスポザラーゼ酵素は、30位におけるアミノ酸置換が、イソロイシン（I）からバリン（V）への置換であり、165位におけるアミノ酸置換が、グリシン（G）からセリン（S）への置換であり、282位におけるアミノ酸置換が、メチオニン（M）からバリン（V）への置換であり、538位におけるアミノ酸置換が、アスパラギン（N）からリシン（K）への置換である、配列番号12の配列のアミノ酸配列を含んでもよい、またはそれからなってもよい。ある特定の実施形態では、Super p i g g y B a c（商標）（s P B o）トランスポザラーゼ酵素は、下記のもの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%またはこれらの間の任意の百分率において同一のアミノ酸配列を含んでもよい、またはそれからなってもよい：

40

【化 7】

1 MGSSLDDEHI LSALLQSDDE LVGEDSDSEV SDHVSEDDVQ SDTEEFIDE VHEVQPTSSG
 61 SEILDEQNV I EQPGSSLASN RILTLPQRTI RGKNKHCWST SKSTRSRVS ALNIVRSQRG
 121 PTRMCRNIYD PLLCFKLFFT DEIISEIVKW TNAEISLKRR ESMTSATFRD TNEDEIYAFF
 181 GILVMTAVRK DNHMSTDDLF DRSLSMVYVS VMSRDRFDL IRCLRMDDKS IRPTLRENDV
 241 FTPVRKIWDL FIHQCIQNYT PGAHLTIDEQ LLGFRGRCPF RVYIPNKPSK YGKILMMCD
 301 SGTKYMINGM PYLGRGTQTN GVPLGEYYVK ELSKPVHGSC RNITCDNWFT SIPLAKNLLQ
 361 EPYKLTIVGT VRSNKREIPE VLKNSRSRPV GTSMFCFDGP LTLVSYKPKP AKMVYLLSSC
 421 DEDASINEST GKPQMVMYYN QTKGGVDTLD QMCSVMTCR KTNRPWPMALL YGMINIACIN
 481 SFIIYSHNVS SKGEKVQSRK KFMRLNLYMSL TSSFMRKRLE APTLKRYLRD NISNILPKEV
 541 PGTSDDSTEE PVMKKRTYCT YCPSKIRKA NASCKKCKKV ICREHNIDMC QSCF (配列番号

10

2)。

【0092】

トランスポザーゼが30、165、282および／または538位に上記の変異を含む
 実施形態を含む、本開示の方法のある特定の実施形態では、p i g g y B a c (商標)ま
 たはS u p e r p i g g y B a c (商標)トランスポザーゼ酵素は、配列番号12また
 は配列番号2の配列の3、46、82、103、119、125、177、180、18
 5、187、200、207、209、226、235、240、241、243、25
 8、296、298、311、315、319、327、328、340、421、43
 6、456、470、486、503、552、570および591位の1つまたは複数
 にアミノ酸置換をさらに含んでもよい。トランスポザーゼが30、165、282および
 ／または538位に上記の変異を含む実施形態を含む、ある特定の実施形態では、p i g
 g y B a c (商標)またはS u p e r p i g g y B a c (商標)トランスポザーゼ酵
 素は、46、119、125、177、180、185、187、200、207、209
 、226、235、240、241、243、296、298、311、315、319
 、327、328、340、421、436、456、470、485、503、552
 および570位の1つまたは複数にアミノ酸置換をさらに含んでもよい。ある特定の
 実施形態では、配列番号12または配列番号2の3位におけるアミノ酸置換は、セリン(S)
 からアスパラギン(N)への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または
 配列番号2の46位におけるアミノ酸置換は、アラニン(A)からセリン(S)への置換
 である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の46位におけるアミ
 ノ酸置換は、アラニン(A)からスレオニン(T)への置換である。ある特定の
 実施形態では、配列番号12または配列番号2の82位におけるアミノ酸置換は、イソロイシ
 ン(I)からトリプトファン(W)への置換である。ある特定の
 実施形態では、配列番号12または配列番号2の103位におけるアミノ酸置換は、セリン(S)から
 プロリン(P)への置換である。ある特定の
 実施形態では、配列番号12または配列番号2の119位に
 おけるアミノ酸置換は、アルギニン(R)からプロリン(P)への置換である。ある特定
 の実施形態では、配列番号12または配列番号2の125位におけるアミノ酸置換は、シ
 ス테인(C)からアラニン(A)への置換である。ある特定の
 実施形態では、配列番号12または配列番号2の125位におけるアミノ酸置換は、シス
 テイン(C)からロイシン(L)への置換である。ある特定の
 実施形態では、配列番号12または配列番号2の177位におけるアミノ酸置換は、チロシ
 ン(Y)からリシン(K)への置換である。ある
 特定の
 実施形態では、配列番号12または配列番号2の177位におけるアミノ酸置換は、
 チロシン(Y)からヒスチジン(H)への置換である。ある特定の
 実施形態では、配列番号12または配列番号2の180位におけるアミノ酸置換は、フェニ
 ルアラニン(F)からロイシン(L)への置換である。ある特定の
 実施形態では、配列番号12または配列番号2の180位におけるアミノ酸置換は、フェ
 ニルアラニン(F)からイソロイシン(I)への置換である。ある特定の
 実施形態では、配列番号12または配列番号2の180
 位におけるアミノ酸置換は、フェニルアラニン(F)からバリン(V)への置換である。

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 1 8 5 位におけるアミノ酸置換は、メチオニン (M) からロイシン (L) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 1 8 7 位におけるアミノ酸置換は、アラニン (A) からグリシン (G) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 0 0 位におけるアミノ酸置換は、フェニルアラニン (F) からトリプトファン (W) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 0 7 位におけるアミノ酸置換は、バリン (V) からプロリン (P) への置換である。ある特定の
10 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 0 9 位におけるアミノ酸置換は、バリン (V) からフェニルアラニン (F) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 2 6 位におけるアミノ酸置換は、メチオニン (M) からフェニルアラニン (F) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 3 5 位におけるアミノ酸置換は、ロイシン (L) からアルギニン (R) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 4 0 位におけるアミノ酸置換は、バリン (V) からリシン (K) への置換である。ある特定の
20 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 4 1 位におけるアミノ酸置換は、フェニルアラニン (F) からロイシン (L) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 4 3 位におけるアミノ酸置換は、プロリン (P) からリシン (K) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 5 8 位におけるアミノ酸置換は、アスパラギン (N) からセリン (S) への置換である。ある特定の
30 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 9 6 位におけるアミノ酸置換は、ロイシン (L) からトリプトファン (W) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 9 6 位におけるアミノ酸置換は、ロイシン (L) からチロシン (Y) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 9 6 位におけるアミノ酸置換は、ロイシン (L) からフェニルアラニン (F) への置換である。ある特定の
40 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 9 8 位におけるアミノ酸置換は、メチオニン (M) からロイシン (L) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 9 8 位におけるアミノ酸置換は、メチオニン (M) からアラニン (A) への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 2 9 8 位におけるアミノ酸置換は、メチオニン (M) からバリン (V) への置換である。ある特定の
50 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 1 1 位におけるアミノ酸置換は、プロリン (P) からイソロイシン (I) への置換である。ある特定の
60 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 1 1 位におけるアミノ酸置換は、プロリン (P) からバリンへの置換である。ある特定の実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 1 5 位におけるアミノ酸置換は、アルギニン (R) からリシン (K) への置換である。ある特定の
70 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 1 9 位におけるアミノ酸置換は、スレオニン (T) からグリシン (G) への置換である。ある特定の
80 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 2 7 位におけるアミノ酸置換は、チロシン (Y) からアルギニン (R) への置換である。ある特定の
90 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 2 8 位におけるアミノ酸置換は、チロシン (Y) からバリン (V) への置換である。ある特定の
100 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 4 0 位におけるアミノ酸置換は、システイン (C) からグリシン (G) への置換である。ある特定の
110 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 3 4 0 位におけるアミノ酸置換は、システイン (C) からロイシン (L) への置換である。ある特定の
120 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 4 2 1 位におけるアミノ酸置換は、アスパラギン酸 (D) からヒスチジン (H) への置換である。ある特定の
130 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 4 3 6 位におけるアミノ酸置換は、バリン (V) からイソロイシン (I) への置換である。ある特定の
140 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 4 5 6 位におけるアミノ酸置換は、メチオニン (M) からチロシン (Y) への置換である。ある特定の
150 実施形態では、配列番号 1 2 または配列番号 2 の 4 7 0 位におけるアミノ酸置換は、ロイシン (L) からフェニルアラニン (F) への置換である。ある特定の

または配列番号2の485位におけるアミノ酸置換は、セリン（S）からリシン（K）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の503位におけるアミノ酸置換は、メチオニン（M）からロイシン（L）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の503位におけるアミノ酸置換は、メチオニン（M）からイソロイシン（I）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の552位におけるアミノ酸置換は、バリン（V）からリシン（K）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の570位におけるアミノ酸置換は、アラニン（A）からスレオニン（T）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の591位におけるアミノ酸置換は、グルタミン（Q）からプロリン（P）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の591位におけるアミノ酸置換は、グルタミン（Q）からアルギニン（R）への置換である。

10

【0093】

トランスポザーゼが30、165、282および／または538位に上記の変異を含む実施形態を含む、本開示の方法のある特定の実施形態では、p i g g y B a c（商標）トランスポザーゼ酵素が、配列番号12または配列番号2の配列の103、194、372、375、450、509および570位の1つもしくは複数にアミノ酸置換を含んでもよく、またはSuper p i g g y B a c（商標）トランスポザーゼ酵素が、そのようなアミノ酸置換をさらに含んでもよい。トランスポザーゼが30、165、282および／または538位に上記の変異を含む実施形態を含む、本開示の方法のある特定の実施形態では、p i g g y B a c（商標）トランスポザーゼ酵素が、配列番号12または配列番号2の配列の103、194、372、375、450、509および570位の2、3、4、5、6つもしくはそれより多くにアミノ酸置換を含んでもよく、またはSuper p i g g y B a c（商標）トランスポザーゼ酵素が、そのようなアミノ酸置換をさらに含んでもよい。トランスポザーゼが30、165、282および／または538位に上記の変異を含む実施形態を含む、ある特定の実施形態では、p i g g y B a c（商標）トランスポザーゼ酵素が配列番号12または配列番号2の配列の103、194、372、375、450、509および570位にアミノ酸置換を含んでもよく、またはSuper p i g g y B a c（商標）トランスポザーゼ酵素が、そのようなアミノ酸置換をさらに含んでもよい。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の103位におけるアミノ酸置換は、セリン（S）からプロリン（P）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の194位におけるアミノ酸置換は、メチオニン（M）からバリン（V）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の372位におけるアミノ酸置換は、アルギニン（R）からアラニン（A）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の375位におけるアミノ酸置換は、リシン（K）からアラニン（A）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の450位におけるアミノ酸置換は、アスパラギン酸（D）からアスパラギン（N）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の509位におけるアミノ酸置換は、セリン（S）からグリシン（G）への置換である。ある特定の実施形態では、配列番号12または配列番号2の570位におけるアミノ酸置換は、アスパラギン（N）からセリン（S）への置換である。ある特定の実施形態では、p i g g y B a c（商標）トランスポザーゼ酵素は、配列番号12の194位におけるメチオニン（M）からバリン（V）への置換を含んでもよい。p i g g y B a c（商標）トランスポザーゼ酵素が配列番号12の194位におけるメチオニン（M）からバリン（V）への置換を含んでもよい実施形態を含む、ある特定の実施形態では、p i g g y B a c（商標）トランスポザーゼ酵素は、配列番号12または配列番号2の配列の372、375および450位にアミノ酸置換をさらに含んでもよい。ある特定の実施形態では、p i g g y B a c（商標）トランスポザーゼ酵素は、配列番号12の194位におけるメチオニン（M）からバリン（V）への置換、配列番号12の372位におけるアルギニン（R）からアラニン（A）への置換、および配列番号12の375

20

30

40

50

位におけるリシン（K）からアラニン（A）への置換を含んでもよい。ある特定の実施形態では、p i g g y B a c（商標）トランスポザーゼ酵素は、配列番号12の194位におけるメチオニン（M）からバリン（V）への置換、配列番号12の372位におけるアルギニン（R）からアラニン（A）への置換、配列番号12の375位におけるリシン（K）からアラニン（A）への置換、および配列番号12の450位におけるアスパラギン酸（D）からアスパラギン（N）への置換を含んでもよい。

【0094】

足場タンパク質

本開示のタンパク質足場は、フィブロネクチンIII型（FN3）リピートタンパク質、コード核酸または相補的核酸、ベクター、宿主細胞、組成物、組み合わせ、製剤、デバイス、ならびにそれらの作製および使用方法に由来し得る。好ましい実施形態では、タンパク質足場は、ヒトテネイシン-C（本明細書では以降「テネイシン」）からの複数のFN3ドメインのコンセンサス配列からなる。さらなる好ましい実施形態では、本発明のタンパク質足場は、15個のFN3ドメインのコンセンサス配列である。本開示のタンパク質足場は、様々な分子、例えば、細胞の標的タンパク質に結合するように設計することができる。好ましい実施形態では、本開示のタンパク質足場は、野生型および／もしくは改変体形態の抗原に結合するように設計することができる。

【0095】

本開示のタンパク質足場は、さらなる分子または部分、例えば、抗体のFc領域、アルブミン結合ドメイン、または半減期に影響を及ぼすその他の部分を含んでもよい。さらなる実施形態では、本開示のタンパク質足場は、該タンパク質足場をコードしうる核酸分子に結合することができる。

【0096】

本開示は、複数のFN3ドメインのコンセンサス配列に基づく少なくとも1つのタンパク質足場を宿主細胞において発現させるための少なくとも1つの方法であって、少なくとも1つのタンパク質足場が検出可能なおよび／または回収可能な量で発現される条件下で、本明細書に記載の宿主細胞を培養するステップを含む方法を提供する。

【0097】

本開示は、（a）本明細書に記載の複数のFN3ドメインおよび／またはコード核酸のコンセンサス配列に基づくタンパク質足場と、（b）好適なおよび／または薬学的に許容される担体もしくは希釈剤とを含む、少なくとも1つの組成物を提供する。

【0098】

本開示は、タンパク質足場のライブラリーを生成する方法であって、タンパク質足場が、フィブロネクチンIII型（FN3）リピートタンパク質、好ましくは、複数のFN3ドメインのコンセンサス配列、より好ましくは、ヒトテネイシンからの複数のFN3ドメインのコンセンサス配列に基づくものである、方法を提供する。ライブラリーは、足場の一部分、例えばループ領域の中の、特定の位置における分子中のアミノ酸またはアミノ酸数を（変異により）変化させることにより足場の逐次的生成を行うことによって、形成される。ライブラリーは、単一ループのアミノ酸組成を変化させることにより、または複数のループをもしくは足場分子のさらなる位置を同時に変化させることにより、生成することができる。変化させるループを、状況に応じて延長または短縮することができる。各位置の可能性のあるすべてのアミノ酸を含むように、またはアミノ酸の設計されたサブセットを含むように、そのようなライブラリーを生成することができる。in vitroまたはCISディスプレイ（DNA、RNA、リボソームディスプレイなど）、酵母、細菌およびファージディスプレイなどの、ディスプレイによるスクリーニングに、ライブラリーメンバーを使用することができる。

【0099】

本開示のタンパク質足場は、還元条件下での安定性、および高濃度での溶解度などの、生物物理的特性の向上を提供し、それらは、E. Coliなどの原核細胞系において、酵母などの真核細胞系において、およびウサギ網状赤血球ライセート系などのin vit

10

20

30

40

50

r o 転写／翻訳系において、発現され、フォールディングされうる。

【0100】

本開示は、本発明の足場ライブラリーを標的に対してパニングし、結合物質を検出することにより、特定の標的に結合する足場分子を生成する方法を提供する。他の関連態様では、本開示は、所望の活性を有する、例えば、ある特定のアフィニティーで標的タンパク質に結合することができる、タンパク質足場を生成またはアフィニティー成熟させるために使用することができる、スクリーニング方法を含む。アフィニティー成熟は、ファージディスプレイまたは *in vitro* ディスプレイなどのシステムを使用する変異誘発と選択の反復ラウンドにより遂行することができる。このプロセスでの変異誘発は、特定の足場残基に対する部位特異的変異誘発、エラープロード PCR に起因するランダム変異誘発、DNA シャフリングおよび／またはこれらの技術の組み合わせの結果であることもある。

10

【0101】

本開示は、限定ではないが哺乳動物由来の足場を含む、フィブロネクチン III 型 (FN3) リピータンパク質のコンセンサス配列に基づく単離された、組換えおよび／または合成タンパク質足場、ならびにコンセンサス FN3 配列に基づくタンパク質足場をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含む組成物およびコード核酸分子を提供する。本開示は、診断および治療組成物、方法およびデバイスを含む、そのような核酸およびタンパク質足場の作製および使用方法を、これらに限定されないが、さらに含む。

【0102】

本開示のタンパク質足場は、局所投与、経口投与、または血液脳関門を通過することができること、哺乳動物細胞発現に対して資源に応じてタンパク質の発現増加が可能である *E. coli* において発現させることができること、複数の標的にまたは同じ標的の複数のエピトープに結合する二重特異性またはタンデム分子に操作されることができること、薬物、ポリマーおよびプローブとコンジュゲートさせることができること、高濃度に製剤化することができること、ならびにそのような分子が罹病組織および腫瘍に有効に浸透することができることなどの、従来の治療薬を超える利点をもたらす。

20

【0103】

さらに、タンパク質足場は、抗体の可変領域を模倣する、それらのフォールディング構造 (fold) に関する抗体の多くの特性を有する。この配向によって FN3 ループを抗体相補性決定領域 (CDR) に同様に曝露することができる。タンパク質足場は、細胞標的に結合することができるはずであり、ある特定の結合または関連特性を改善するようにループを変化させること、例えば、アフィニティー成熟させることができる。

30

【0104】

本開示のタンパク質足場の 6 つのループのうちの 3 つは、抗体の相補性決定領域 (CDR1~3)、すなわち抗原結合領域に、位相幾何学的に対応するが、残りの 3 つのループは、抗体 CDR と同様に表面に露出されている。これらのループは、配列番号 13 の残基 13~16、22~28、38~43、51~54、60~64、および 75~81 に、またはその辺りにわたる。好ましくは、残基 22~28、51~54、および 75~81 のまたはその辺りのループ領域は、結合特異性およびアフィニティーのために変えられる。これらのループ領域の 1 つまたは複数他ループ領域でおよび／またはそれらの配列を骨格部分として維持する他のストランドでランダム化してライブラリーに追加し、特定のタンパク質標的に対して高いアフィニティーを有するライブラリーから強力な結合物質を選択することができる。ループ領域の 1 つまたは複数は、タンパク質との抗体 CDR 相互作用と同様に標的タンパク質と相互作用することができる。

40

【0105】

本開示の足場は、抗体模倣物を含んでもよい。

【0106】

用語「抗体模倣物」は、標的配列に特異的に結合し、天然に存在する抗体とは異なる構造を有する、有機化合物を記述することを意図したものである。抗体模倣物は、タンパク

50

質、核酸、または小分子を含みうる。本開示の抗体模倣物が特異的に結合する標的配列は、抗原でありうる。抗体模倣物は、これらに限定されないが、優れた溶解度、組織浸透、熱および酵素に対する安定性（例えば、酵素的分解に対する耐性）、ならびにより低い生産コストを含む、抗体を超える優れた特性を提供することができる。例示的な抗体模倣物は、アフイボディ（affibody）、アフイリン（affilinin）、アフイマー（affimer）、アフイチン（affitin）、アルファボディ（alphabody）、アンチカリン（anticalin）、およびアビマー（avimer）（アビディティー多量体（avidity multimer）としても公知）、DARPin（設計されたアンキリンリピートタンパク質）、フィノマー（Fynomer）、クニツドメインペプチド（Kunitz domain peptide）、およびモノボディ（monobody）を含むが、これらに限定されない。

10

【0107】

本開示のアフィボディ分子は、ジスルフィド架橋が一切ない1つもしくは複数のアルファヘリックスを含む、またはそれからなるタンパク質足場を含む。好ましくは、本開示のアフィボディ分子は、3つのアルファヘリックスを含む、またはそれらからなる。例えば、本開示のアフィボディ分子は、免疫グロブリン結合ドメインを含んでもよい。本開示のアフィボディ分子は、プロテインAのZドメインを含んでもよい。

【0108】

本開示のアフィリン分子は、例えばガンマーBクリスタリンまたはユビキチンのいずれかの、露出したアミノ酸の修飾により産生されたタンパク質足場を含む。アフィリン分子は、抗原への抗体のアフィニティーを機能的に模倣するが、構造的には抗体を模倣しない。アフィリンを作製するために使用されるいずれのタンパク質足場においても、正しくフォールディングされたタンパク質分子中の溶媒または可能性のある結合パートナーに接近しやすいアミノ酸は、露出したアミノ酸と見なされる。これらの露出したアミノ酸のいずれか1つまたは複数を、標的配列または抗原に特異的に結合するように修飾することができる。

20

【0109】

本開示のアフィマー分子は、特異的標的配列に対する高アフィニティー結合部位を提供するペプチドループを提示するように操作された高安定性タンパク質を含むタンパク質足場を含む。本開示の例示的なアフィマー分子は、シスタチンタンパク質またはその三次構造に基づくタンパク質足場を含む。本開示の例示的なアフィマー分子は、逆平行ベータシートの頂部に位置するアルファヘリックスを含む共通三次構造を共有しうる。

30

【0110】

本開示のアフィチン分子は、その構造が、例えば、DNA結合タンパク質（例えば、DNA結合タンパク質Sac7d）に由来しうる、人工タンパク質足場を含む。本開示のアフィチンは、標的配列に選択的に結合し、標的配列は、抗原全体であってもよく、またはその一部であってもよい。本開示の例示的なアフィチンは、DNA結合タンパク質の結合表面の1つまたは複数のアミノ酸配列をランダム化し、結果として得られたタンパク質をリボソームディスプレイおよび選択に付すことによって、製造される。本開示のアフィチンの標的配列は、例えば、ゲノム内で、またはペプチド、タンパク質、ウイルスもしくは細菌の表面で見いだすことができる。本開示のある特定の実施形態では、アフィチン分子を酵素の特異的阻害剤として使用することができる。本開示のアフィチン分子は、耐熱性タンパク質またはその誘導体を含んでもよい。

40

【0111】

本開示のアルファボディ分子は、細胞浸透アルファボディ（Cell-Penetrating Alphabody）（CPAB）と称されることもある。本開示のアルファボディ分子は、様々な標的配列（抗原を含む）に結合する小型タンパク質（典型的には10kDa未満）を含む。アルファボディ分子は、細胞内標的配列に到達することができ、該配列に結合することができる。構造的には、本開示のアルファボディ分子は、一本鎖アルファヘリックス（天然に存在するコイルドコイル構造に類似している）を形成する人工

50

配列を含む。本開示のアルファボディ分子は、標的タンパク質に特異的に結合するように修飾されている1つまたは複数のアミノ酸を含むタンパク質足場を含んでもよい。分子の結合特異性に関係なく、本開示のアルファボディ分子は、正しいフォールディングおよび熱安定性を維持する。

【0112】

本開示のアンチカリン分子は、タンパク質または小分子のいずれかにおける標的配列または部位に結合する人工タンパク質を含む。本開示のアンチカリン分子は、ヒトリボカリンに由来する人工タンパク質を含んでもよい。本開示のアンチカリン分子を、例えば、モノクローナル抗体またはそれらの断片の代わりに使用してもよい。アンチカリン分子は、モノクローナル抗体またはそれらの断片より優れた組織浸透および熱安定性を示すことができる。本開示の例示的なアンチカリン分子は、おおよそ20 kDaの質量を有する、約180のアミノ酸を含みうる。構造的には、本開示のアンチカリン分子は、ループによりペアごとに接続されている逆平行ベータストランドを含むバレル構造と結合しているアルファヘリックスとを含む。好ましい実施形態では、本開示のアンチカリン分子は、ループによりペアごとに接続されている8つの逆平行ベータストランドを含むバレル構造および結合しているアルファヘリックスを含む。

10

【0113】

本開示のアビマー分子は、標的配列（抗原であってもよい）に特異的に結合する人工タンパク質を含む。本開示のアビマーは、同じ標的内のまたは異なる標的内の複数の結合部位を認識することができる。本開示のアビマーが、1つより多くの標的を認識する場合、アビマーは、二重特異性抗体の機能を模倣する。人工タンパク質アビマーは、各々がおおよそ30～35アミノ酸の2つまたはそれより多くのペプチド配列を含んでもよい。これらのペプチドは、1つまたは複数のリンカーペプチドによって接続されていることもある。アビマーのペプチドの1つまたは複数についてのアミノ酸配列は、膜受容体のAドメインに由来することもある。アビマーは、ジスルフィド結合および／またはカルシウムを任意選択で含んでもよい、硬い構造を有する。本開示のアビマーは、抗体と比較して高い熱安定性を示すことができる。

20

【0114】

本開示のDARPin（設計されたアンキリンリピートタンパク質）は、標的配列に対して高い特異性および高いアフィニティを有する、遺伝子操作された、組換えまたはキメラタンパク質を含む。ある特定の実施形態では、本開示のDARPinは、アンキリンタンパク質に由来し、任意選択で、アンキリンタンパク質の少なくとも3つのリピートモチーフ（反復構造ユニットとも称される）を含む。アンキリンタンパク質は、高アフィニティタンパク質間相互作用を媒介する。本開示のDARPinは、大きい標的相互作用表面を含む。

30

【0115】

本開示のフィノマーは、ヒトFyn SH3ドメインに由来する小型結合タンパク質（約7 kDa）であって、抗体と同等のアフィニティおよび同等の特異性で標的配列および分子に結合するように操作された小型結合タンパク質を含む。

【0116】

本開示のクニツドメインペプチドは、クニツドメインを含むタンパク質足場を含む。クニツドメインは、プロテアーゼ活性を阻害するための活性部位を含む。構造的には、本開示のクニツドメインは、ジスルフィドに富むアルファ+ベータフォールディング構造を含む。この構造は、ウシ膵臓トリプシンインヒビターにより例示される。クニツドメインペプチドは、特異的タンパク質構造を認識し、競合的プロテアーゼ阻害剤として役立つ。本開示のクニツドメインは、エカランチド（ヒトリボタンパク質関連凝固阻害剤（LACI）に由来する）を含んでもよい。

40

【0117】

本開示のモノボディは、サイズが一本鎖抗体に匹敵する小型タンパク質（約94個のアミノ酸を含み、約10 kDaの質量を有する）である。これらの遺伝子操作されたタンパ

50

ク質は、抗原を含む標的配列に特異的に結合する。本開示のモノボディは、1つまたは複数の別個のタンパク質または標的配列を特異的に標的とすることができる。好ましい実施形態では、本開示のモノボディは、ヒトフィブロネクチンの構造を模倣する、およびより好ましくは、フィブロネクチンの10番目の細胞外III型ドメインの構造を模倣する、タンパク質足場を含む。フィブロネクチンの10番目の細胞外III型ドメイン、およびそのモノボディ模倣物は、バレルを形成する7つのベータシートを含有し、かつそれぞれの側面に抗体の3つの相補性決定領域(CDR)に対応する3つの露出したループを含有する。抗体の変域ドメインの構造とは対照的に、モノボディには、金属イオンのための結合部位が一切なく、中央のジスルフィド結合もない。ループBCおよびFGを修飾することにより、多重特異性モノボディを最適化することができる。本開示のモノボディは、アドネクチンを含んでもよい。

10

【0118】

そのような方法は、有効量の、少なくとも1つの足場タンパク質を含む組成物または医薬組成物を、症状、効果またはメカニズムのそのようなモジュレーション、処置、緩和、予防または低減を必要とする細胞、組織、器官、動物または患者に投与するステップを含むことができる。有効量は、本明細書に記載されるまたは関連技術分野において公知であるように、公知の方法を使用して行われ、決定されるような、単回(例えば、ボラス)、複数回もしくは連続投与による約0.001~500mg/kgの量、または単回、複数回もしくは連続投与により血清中濃度0.01~5000μg/mlという血清中濃度を達成するための量、またはこれらのうちの任意の有効な範囲もしくは値を含むことができる。

20

【0119】

足場タンパク質の産生および生成

本開示の少なくとも1つの足場タンパク質を、当技術分野において周知であるような、細胞株、混合細胞株、不死化細胞、または不死化細胞のクローン集団によって、任意選択で産生させることができる。例えば、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons, Inc., NY, N. Y. (1987~2001年); Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor, N. Y. (1989年); Harlow および Lane、Antibodies, a Laboratory Manual、Cold Spring Harbor, N. Y. (1989年); Colliganら編、Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons, Inc., NY (1994~2001年); Colliganら、Current Protocols in Protein Science、John Wiley & Sons, NY, N. Y.、(1997~2001年)を参照されたい。

30

【0120】

足場タンパク質からのアミノ酸を変化、付加および/または欠失させて、免疫原性を低下させることができ、または結合、アフィニティー、会合速度(on-rate)、解離速度(off-rate)、アビディティー、特異性、半減期、安定性、溶解度、もしくは当技術分野において公知の任意の他の好適な特性を低下、向上もしくは修飾することができる。

40

【0121】

任意選択で、抗原に対する高いアフィニティーおよび他の有利な生物学的特性を保持した足場タンパク質を操作し得る。この目標を達成するために、足場タンパク質を、任意選択で、親配列および操作された配列の三次元モデルを使用する親配列および様々な概念上操作された産物の分析プロセスにより、調製することができる。三次元モデルは市販されており、当業者に知られている。選択された候補配列のほぼ確実な三次元コンフォメーション構造を図示および表示するコンピュータプログラムであって、可能性のある免疫原性

50

を測定することができるコンピュータプログラムが、利用可能である（例えば、Monrovia、Calif. のXencor, Inc. のImmunofilterプログラム）。これらの表示の精査により、候補配列が機能する上での残基の可能性の高い役割の分析、すなわち、その抗原に結合する候補足場タンパク質の能力に影響を与える残基の分析が可能になる。このようにして、残基を、標的抗原に対するアフィニティーなどの所望の特性が達成されるように親配列および参照配列から選択し、組み合わせることができる。あるいは、または上記手順に加えて、他の好適な操作方法を使用することができる。

【0122】

足場タンパク質のスクリーニング

類似のタンパク質または断片への特異的結合についてのタンパク質足場のスクリーニングは、ヌクレオチド（DNAもしくはRNAディスプレイ）またはペプチドディスプレイライブラリー、例えばin vitroディスプレイを使用して、便利に達成することができる。この方法は、所望の機能または構造を有する個々のメンバーについてペプチドの大きなコレクションをスクリーニングすることを含む。提示されるヌクレオチドまたはペプチド配列は、長さが3～5000ヌクレオチドもしくはアミノ酸またはそれより長いこともあり、高頻度に5～100アミノ酸長でありえ、多くの場合、約8～25アミノ酸長でありうる。ペプチドライブラリーを生成するための直接化学合成法に加えて、いくつかの組換えDNA法が記載されている。1つのタイプは、バクテリオファージまたは細胞の表面でのペプチド配列の提示を含む。各バクテリオファージまたは細胞は、提示される特定のペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を含有する。そのような方法は、PCT特許公開第91/17271号、同第91/18980号、同第91/19818号および同第93/08278号に記載されている。

【0123】

ペプチドのライブラリーを生成するための他のシステムは、in vitroでの化学合成法と組換え法の両方の態様を有する。PCT特許公開第92/05258号、同第92/14843号、および同第96/19256号を参照されたい。米国特許第5,658,754号および同第5,643,768号も参照されたい。ペプチドディスプレイライブラリー、ベクター、およびスクリーニングキットは、Invitrogen (Carlsbad, Calif.) およびCambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, UK) のような供給業者から市販されている。例えば、Enzonに譲渡された米国特許第4,704,692号、同第4,939,666号、同第4,946,778号、同第5,260,203号、同第5,455,030号、同第5,518,889号、同第5,534,621号、同第5,656,730号、同第5,763,733号、同第5,767,260号、同第5,856,456号；Dyaxに譲渡された同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,571,698号、同第5,837,500号；Affymaxに譲渡された同第5,427,908号、同第5,580,717号；Cambridge Antibody Technologiesに譲渡された同第5,885,793号；Genentechに譲渡された同第5,750,373号；Xomaに譲渡された同第5,618,920号、同第5,595,898号、同第5,576,195号、同第5,698,435号、同第5,693,493号、同第5,698,417号；Colligan、上掲；Ausubel、上掲；またはSambrook、上掲を参照されたい。

【0124】

本開示のタンパク質足場は、ヒトまたは他の哺乳動物タンパク質に広範なアフィニティー（KD）で結合することができる。好ましい実施形態では、本発明の少なくとも1つのタンパク質足場は、表面プラズモン共鳴またはKinExA法によって当業者により実施されるように決定して、高いアフィニティーで、例えば、これらに限定されないが0.1～9.9（またはこれらの中の任意の範囲もしくは値） $\times 10^{-8}$ 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 、 10^{-14} 、 10^{-15} 、またはこれらの中の任意の範囲もしくは値などの、約 10^{-7} Mであるかまたはそれ未満のKDで、標的タ

ンパク質に任意選択で結合することができる。

【0125】

任意の好適な方法を使用して、抗原に対するタンパク質足場のアフィニティーまたはアビディティーを実験的に決定することができる。（例えば、Berzofskyら、「Antibody-Antigen Interactions」、In Fundamental Immunology、Paul, W. E. 編、Raven Press: New York、N. Y.（1984年）；Kuby、Janis Immunology、W. H. Freeman and Company: New York、N. Y.（1992年）；および本明細書に記載の方法を参照されたい）。特定のタンパク質足場－抗原相互作用のアフィニティー測定値は、異なる条件（例えば、塩濃度、pH）下で測定された場合、変わることがある。したがって、アフィニティーおよび他の抗原結合パラメータ（例えば、KD、Kon、Koff）の測定は、好ましくは、タンパク質足場および抗原の標準化溶液、および本明細書に記載の緩衝液などの標準化緩衝液を用いて行われる。

10

【0126】

競合アッセイを本開示のタンパク質足場に関して行って、どのようなタンパク質、抗体および他のアンタゴニストが標的タンパク質への結合について本発明のタンパク質足場と競合するのか、および／またはエピトープ領域を共有するのかを、決定することができる。これらのアッセイは、当業者には容易に公知であるように、タンパク質上の限られた数の結合部位についてアンタゴニストまたはリガンド間の競合を評価する。タンパク質および／または抗体を競合前または後に固定化または不溶化し、標的タンパク質に結合した試料を、例えば、デカント（タンパク質／抗体を事前に不溶化した場合）により、または遠心分離（タンパク質／抗体を競合反応後に沈殿させた場合）により、非結合試料から分離する。また、競合的結合は、機能が、タンパク質足場の標的タンパク質への結合により変化するのか、またはその結合の欠如により変化するのか、例えば、タンパク質足場分子が、例えば標識の、酵素活性を阻害するのか、または増強するのかによって、決定することができる。当技術分野において周知であるように、ELISAおよび他の機能アッセイを使用してもよい。

20

【0127】

核酸分子

30

タンパク質足場をコードする本開示の核酸分子は、mRNA、hnRNA、tRNAもしくは任意の他の形態などの、RNAの形態であってもよく、またはクロニングにより得られるかもしくは合成により産生されるcDNAおよびゲノムDNAをこれらに限定されないが含む、DNA形態であってもよく、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。DNAは、三本鎖、二本鎖もしくは一本鎖であってもよく、または任意のこれらの組み合わせであってもよい。DNAまたはRNAの少なくとも1本の鎖の任意の部分が、センス鎖としても公知のコード鎖であってもよく、またはアンチセンス鎖とも称される非コード鎖であってもよい。

【0128】

本開示の単離された核酸分子は、1つまたは複数のイントロンを任意選択で有するオープンリーディングフレーム（ORF）、例えば、これに限定されないが、少なくとも1つのタンパク質足場の少なくとも1つの指定部分を含む、核酸分子；標的タンパク質に結合するタンパク質足場またはループ領域についてのコード配列を含む核酸分子；および上記のものとは実質的に異なるヌクレオチド配列を含むが、遺伝コードの縮重に起因して、本明細書に記載されるようなおよび／または当技術分野において公知であるようなタンパク質足場を依然としてコードする核酸分子を含むことができる。もちろん、遺伝コードは、当技術分野において周知である。したがって、本発明の特異的タンパク質足場をコードするそのような縮重核酸改変体を生成することは、当業者には慣例的なことである。例えば、Ausubelら、上掲を参照のこと、そのような核酸改変体は、本発明に含まれる。

40

【0129】

50

本明細書で述べられるように、タンパク質足場をコードする核酸を含む本開示の核酸分子は、それ自体でタンパク質足場断片のアミノ酸配列をコードするもの；タンパク質足場全体またはその一部分についてのコード配列；タンパク質足場、断片または一部分についてのコード配列、ならびに転写、スプライシングを含むmRNAプロセッシングおよびポリアデニル化シグナル（例えば、リボソーム結合およびmRNAの安定化）において役割を果たす転写された非翻訳配列などの、非コード5'および3'配列（しかし、これらに限定されない）を含むさらなる非コード配列とともに、少なくとも1つのイントロンなどの上述のさらなるコード配列を伴う、または伴わない、少なくとも1つのシグナルリーダーまたは融合ペプチドのコード配列などのさらなる配列；さらなる機能性を提供するものの、さらなるアミノ酸をコードするさらなるコード配列をコードするものを含むことができるが、これらに限定されない。したがって、タンパク質足場をコードする配列を、タンパク質足場断片または部分を含む融合タンパク質足場の精製を助長するペプチドをコードする配列などの、マーカー配列と、融合させることができる。

10

【0130】

本明細書に記載のポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイズするポリヌクレオチド

本開示は、選択的ハイブリダイゼーション条件下で本明細書に開示されるポリヌクレオチドとハイブリダイズする、単離された核酸を提供する。したがって、この実施形態のポリヌクレオチドは、そのようなポリヌクレオチドを含む核酸の単離、検出および／または定量に使用することができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドを使用して、寄託ライブラリー内の部分的または完全長クローンを同定すること、単離すること、または増幅させることができる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ヒトまたは哺乳動物核酸ライブラリーからのcDNAから単離された、さもなければそれと相補的な、ゲノムまたはcDNA配列である。

20

【0131】

好ましくは、cDNAライブラリーは、少なくとも80%完全長配列、好ましくは少なくとも85%または90%完全長配列、およびより好ましくは少なくとも95%完全長配列を含む。cDNAライブラリーを正規化して、稀な配列の表示を増加させることができる。低または中等度ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、排他的にはないが、通常は、相補配列に対する配列同一性が低下した配列に関して用いられる。同一性がより高い配列には、任意選択で、中等度および高ストリンジェンシー条件を用いることができる。低ストリンジェンシー条件は、約70%配列同一性を有する配列の選択的ハイブリダイゼーションを可能にし、オルソログスまたはパラログス配列を同定するために用いることができる。

30

【0132】

任意選択で、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載のポリヌクレオチドによりコードされたタンパク質足場の少なくとも一部分をコードすることになる。本発明のポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質足場をコードするポリヌクレオチドへの選択的ハイブリダイゼーションに用いることができる核酸配列を包含する。例えば、各々全体が参照により本明細書に援用される、Ausubel、上掲、Colligan、上掲を参照されたい。

40

【0133】

核酸の構築

本開示の単離された核酸は、当技術分野において周知であるような、(a)組換え法、(b)合成技術、(c)精製技術、および／または(d)これらの組み合わせを使用して作製することができる。

【0134】

核酸は、本発明のポリヌクレオチドに加えて便利に配列を含んでもよい。例えば、1つまたは複数のエンドヌクレアーゼ制限部位を含むマルチクローニング部位を、ポリヌクレオチドの単離に役立つように核酸に挿入することができる。また、翻訳可能な配列を、本開示の翻訳されたポリヌクレオチドの単離に役立つように挿入することができる。例えば

50

、ヘキサヒスチジンマーカ配列は、本開示のタンパク質を精製するための便利な手段を提供する。コード配列を含まない本開示の核酸は、任意選択で、本開示のポリヌクレオチドのクローニングおよび／または発現のためのベクター、アダプターまたはリンカーである。

【0135】

さらなる配列を、そのようなクローニングおよび／または発現配列に、クローニングおよび／または発現におけるそれらの機能を最適化するように、ポリヌクレオチドの単離に役立つように、またはポリヌクレオチドの細胞への導入を改善するように付加させることができる。クローニングベクター、発現ベクター、アダプターおよびリンカーの使用は、当技術分野において周知である。（例えば、Ausubel、上掲；またはSambrook、上掲を参照されたい）。

10

【0136】

核酸を構築するための組換え法

本開示の単離された核酸組成物、例えば、RNA、cDNA、ゲノムDNAまたはこれらの任意の組み合わせは、当業者に公知の任意の数のクローニング法を使用して生物学的供給源から得ることができる。一部の実施形態では、ストリンジェントな条件下で本発明のポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブが、cDNAまたはゲノムDNAライブラリー内の所望の配列を同定するために使用される。RNAの単離、ならびにcDNAおよびゲノムライブラリーの構築は、当業者に周知である。（例えば、Ausubel、上掲；またはSambrook、上掲を参照されたい）。

20

【0137】

核酸スクリーニングおよび単離方法

本開示のポリヌクレオチドの配列に基づくプローブを使用して、cDNAまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることができる。プローブを使用してゲノムDNAまたはcDNA配列とハイブリダイズさせて、同じまたは異なる生物における相同遺伝子を単離することができる。様々な程度のハイブリダイゼーションのストリンジェンシーをアッセイで用いることができること、およびハイブリダイゼーションまたは洗浄媒体がストリンジェントでありうることは、当業者には理解される。ハイブリダイゼーションの条件が、よりストリンジェントになると、二重鎖形成が起こるためのプローブと標的との間に、より大きな程度の相補性が存在するはずである。ストリンジェンシーの程度は、温度、イオン強度、pH、およびホルムアミドなどの部分的に変性させる溶媒の存在のうちの1つまたは複数により、制御することができる。例えば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、例えば0%～50%の範囲内のホルムアミドの濃度の操作によって、反応物溶液の極性を変化させることにより、便利に変えられる。検出可能な結合に求められる相補性（配列同一性）度は、ハイブリダイゼーション媒体および／または洗浄媒体のストリンジェンシーに従って変わることになる。相補性の程度は、最適には100%、または70～100%、またはこれらの中の任意の範囲もしくは値である。しかし、プローブおよびプライマーの小さい配列差異を、ハイブリダイゼーションおよび／または洗浄媒体のストリンジェンシーを低下させることにより、補償することができることは理解されるべきである。

30

40

【0138】

RNAまたはDNAの増幅方法は当技術分野において周知であり、そのような方法を、本明細書で提示される教示およびガイダンスに基づいて、過度の実験なしに本開示に従って使用することができる。

【0139】

公知のDNAまたはRNA増幅方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）および関連増幅プロセス（例えば、Mullisらの米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、同第4,800,159号、同第4,965,188号；Taborらの同第4,795,699号および同第4,921,794号；Innisの同第5,142,033号；Wilsonらの同第5,122,464号；Innisの同第5,09

50

1, 310号; Gyllensteinらの同第5, 066, 584号; Gelfandらの同第4, 889, 818号; Silverらの同第4, 994, 370号、Biswasの同第4, 766, 067号; Ringoldの同第4, 656, 134号を参照されたい)、ならびに二本鎖DNA合成の鋳型として標的配列に対するアンチセンスRNAを使用するRNA媒介増幅(商標名NASBAである、Malekらの米国特許第5, 130, 238号)を含むが、これらに限定されず、前記参照文献の全内容が参照により本明細書に援用される。(例えば、Ausubel、上掲; またはSambrook、上掲を参照されたい)。

【0140】

例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を使用して、本開示のポリヌクレオチドおよび関連遺伝子の配列を直接ゲノムDNAまたはcDNAライブラリーから増幅することができる。PCRおよび他の*in vitro*増幅方法も、例えば、発現させるべきタンパク質をコードする核酸配列のクローニングに、試料中の所望のmRNAの存在を検出するためのプローブとして使用するための核酸の作製に、核酸シーケンシングに、または他の目的に有用でありうる。*in vitro*増幅方法による当業者に指示するのに十分な技術の例は、Berger、上掲、Sambrook、上掲、およびAusubel、上掲、ならびにMullisら、米国特許第4, 683, 202号(1987年)、およびInnisら編、PCR Protocols A Guide to Methods and Applications、Academic Press Inc.、San Diego、Calif. (1990年)において見いだされる。ゲノムPCR増幅用の市販のキットは、当技術分野において公知である。例えば、Advantage-2 GC Genomic PCR Kit (Clontech)を参照されたい。加えて、例えば、T4遺伝子32タンパク質(Boehringer Mannheim)を使用して、長いPCR産物の収量を改善することができる。

【0141】

核酸を構築するための合成方法

本開示の単離された核酸を、公知の方法による直接化学合成により調製することもできる(例えば、Ausubelら、上掲を参照されたい)。化学合成は、一般に、一本鎖オリゴヌクレオチドを産生し、その一本鎖オリゴヌクレオチドを、相補配列とのハイブリダイゼーションにより、または鋳型として一本鎖を使用するDNAポリメラーゼを用いる重

【0142】

組換え発現カセット

本開示は、本開示の核酸を含む組換え発現カセットをさらに提供する。本開示の核酸配列、例えば、本開示のタンパク質足場をコードするcDNAまたはゲノム配列を使用して、少なくとも1つの所望の宿主細胞に導入することができる組換え発現カセットを構築することができる。組換え発現カセットは、所期の宿主細胞におけるポリヌクレオチドの転写を指示する転写開始調節配列に作動可能に連結された本開示のポリヌクレオチドを通常

【0143】

一部の実施形態では、プロモーター、エンハンサーまたは他のエレメントとして役立つ単離された核酸を、非異種形態の本開示のポリヌクレオチドの適切な位置(イントロンの上流、下流またはイントロン内)に導入して、本開示のポリヌクレオチドの発現を上方制御または下方制御することができる。例えば、内在性プロモーターを、変異、欠失および/または置換により*in vivo*または*in vitro*で変化させることができる。

【0144】

ベクターおよび宿主細胞

本開示は、本開示の単離された核酸分子を含むベクター、組換えベクターを用いて遺伝子操作される宿主細胞、および当技術分野において周知であるような組換え技術による少なくとも1つのタンパク質足場の産生にも関する。例えば、各々全体が参照により本明細書に援用される、Sambrookら、上掲、Ausubelら、上掲を参照されたい。

【0145】

例えば、PB-EF1aベクターを使用してもよい。このベクターは、次のヌクレオチド配列を含む：

【化8-1】

tgatcatagattaaccctagaaagataatcatattgtgacgtacgttaaagataatcatgcgtaaaattgacgcatgtgtttatcggtctgta
tatcgagggtttatttattaatttgaatagatattaagttttattatatttacacttacataactaataataaattcaacaaacaattatttatgtttattt
atttattaaaaaaaaacaaaactcaaaatttctctataaagtaacaaaactttatcgaatactgcagccccgggggatgcagagggac
agcccccccccaagccccagggatgaattacgtccctccccgctagggggcagcagcagccgccccggggctccgctccg
gtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtcgggggacagccgggcacggggaagggtggcacgggatcgcttctct
ctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctggggggataggggaaaagttgactgtgctttcgatcgaacctggaca
gttagctttgcaaagatggataaagtttaaacagagaggaatctttgcagctaattggaccttctaggtcttgaaggagtgggaattggc
tccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgccacagtcctccgagaagttggggggagggggtcggaattgaaccggtgcct
agagaagggtggcgcggggtaaactgggaaagtgaatgctgactggctccgcttttcccgagggtgggggagaaccgtatataa
gtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggttaagtccgtgtgtgttcccgcgggcctggc
ctctttacgggttatggccttgcgtgcttgaattactccacctggctgcagtacgtgattctgatcccgagcttcgggttgaagtgg
gtgggagagttcaggccttgcgttaaggagccccctcgccctgctgctgagttgaggcctggcctggcgctggggccgcccgt
ggcaatctgggtggcaccttcgcgcctgtctgctgctttcgataagtctctagccattaaaaattttgatgacctgctgcgacctttttct
ccagcgcacatgttcggcgaggcggggcttcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgc
tctggtgcctggcctcgccgcccgtgtatcgccccgccctggggcggaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaa
agatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcaccaca
caaaggaaaaggcctttccgtcctcagccgtcgttcatgtgactccacggagtaccgggcgcctccaggcacctcgattagttct
cgagcttttgagtagctgctcttttaggttggggggagggggtttatcgatggagttccccacactgagtggtggagactgaagtta
ggccagcttggcacttgatgtaattctccttgaatttgcctttttgagtttgatcttgggttcattctcaagcctcagacagtgggttcaaagt
tttttctccatttcagggtgctgtagaattctaatacagactcactataggggtgtgctgtctcatcattttggcaagattggccaccaagctt

10

20

30

gtcttcgacggagggtcgacgcccctagacggcgccgctccggatccacgggtaccgatcacatatgaccttaataaacactagtt
ctatagtgtcacctaaattccctttagttaggggtaatatggccgtagggccgagaaattgggtccagacatgataagatacattgatagtt
tggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaattgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaat
aaacaagftaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggagggtgtgggagggtttttcggactctaggacctgcgcatg
cgcttggcgtaatcatggctatagctgtttcctgttttccccgatccccccagggtgctgcagggtcaaagagcagcgagaagcggtca
gaggaaagcgatcccggtgccaccttccccgtgcccgggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcggggggagcgccggg
ccggagcgagccccggggcggtcgtcgtcgtccccctagcgggggaggagcgttaattacatccctggggggctttggggggggggc
tgccctctcaccgcggtggagctccagctttgttcgaattggggccccccctcgagggtatcgatgatatctataacaagaaaatatat
atataataagttatcacgtaagtagaacatgaaataacaatataattatcgatagtgtaaatcttaaaagtcacgtaaaagataatcatcg
tcattttgactcacgcggtcgttatagttaaatacagtgacacttaccgcattgacaagcacgcctcacgggagctccaagcgggcgact
gagatgtcctaaatgcacagcgacggatcgcgctatttagaaagagagagcaatattcaagaatgcattgcgtcaattttacgcagact
atctttctaggggtaattctagctagccttaaggcgccctattgcgttcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagc
tgcattaatgaatcgccaacgcgccccgagaggcggttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgcctgcgctcg
gtcgttcggctcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggttaacaggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaa
catgacaaaaatccctaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttct
gcgctaatctgctgcttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtgggttgggttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaa
ggtaactggcttcagcagagcgagataccaaalactgttctctagtgtagccgtagtagggccaccacttcaagaactctgtagcacc
gcctacataacctcgtcgtgtaacctgttaccagtgggtcgtgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgata
gttaccgggataaggcgagcgggtcgggtgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactg
agatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttccgaaggggagaaaggcgagacggtatccggttaagcggcagggctg
gaacaggagagcgacgagggagcttcagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttgcgccacctgtacttgagcg
tcgatttttgtgatgctcgtcagggggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttaccggttcttggccttttgcgtggcc
ttttgtcacatgagattatcaaaaagatcttccactagatccttttaataatfaaaatgaagtfttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaa
cttggctgcacagtcagaagaactcgtcaagaaggcgatagaaggcgatgcgtcgcgaatcgggagcgggcgataccgtaaagcac
gaggaagcggctcagccattcgcgccaagctcttcagcaataacacgggtagccaacgctatgtcctgatagcgggtccgccacacc
cagccggccacagtcgatgaatccagaaaagcgggcattttccaccatgatattcggcaagcaggcatcgccatgggtcacgacgag
atcctcgcgctcgggcatgctgccttgagcctggcgaaacagttcggctggcgagccccctgatgctcttcgtccagatcatcctgat
cgacaagaccggcttccatccgagtagctgtcgtcgtgatcgatgttctgcttgggtgggtcgaatgggcagggttagccggatcaagcgt
atgcagccgcccgatgcatcagccatgatggatatttctcggcaggagcaagggtgagatgacaggagatcctgccccggcacttc
gccaatagcagccagtcccttcccgttcagtgacaacgtcagcacagctgcgcaaggaaacgccgctgtggccagccacgata
gccggtcgtcctcgtcttgagttcattcagggcaccggacaggtcggcttgcacaaaagaaccggggcgccccctgcgctgacagcc
ggaacacggcggtatcagagcagccgattgtctgtgtgccagtcatagccgaatagcctctccaccaagcgggccggagaacct
gcgtgcaatccatctgttcaatcataatattattgaagcattatcagggttcgtctcgtccccgttctctccaatgcattgcaatattggc

cattagccatattattcatttggttatatagcataaaatcaatataggctattggccattgcatacgttgatctataicataala

【 0 1 4 6 】

40

ポリヌクレオチドを、任意選択で、宿主内での増殖のための選択可能マーカ含有するベクターに連結させることができる。一般に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿物などの沈殿物の中に、または荷電脂質との複合体の中に導入される。ベクターがウイルスである場合、適切なパッケージング細胞株を *in vitro* で使用してそのウイルスをパッケージし、その後、宿主細胞に形質導入することができる。

【0147】

DNA インサートは、適切なプロモーターに動作可能に連結させるべきである。発現構築物は、転写開始、終結のための部位、および転写領域内に翻訳のためのリボソーム結合部位をさらに含有することになる。構築物により発現される成熟転写物のコード部分は、好ましくは、翻訳されることになる mRNA の始点に翻訳開始コドンおよび終点に適切に位置する終結コドン（例えば、UAA、UGA または UAG）を含み、哺乳動物または真核細胞発現には、UAA および UAG が好ましい。

【0148】

発現ベクターは、少なくとも 1 つの選択可能マーカを含むことが好ましいが、任意選択である。そのようなマーカは、例えば、これらに限定されないが、アンピシリン、ゼオシン (Sh b l a 遺伝子)、ピューロマイシン (p a c 遺伝子)、ハイグロマイシン B (h y g B 遺伝子)、G 4 1 8 / ジェネティシン (n e o 遺伝子)、ミコフェノール酸、またはグルタミンシンテターゼ (G S、米国特許第 5, 1 2 2, 4 6 4 号、同第 5, 7 7 0, 3 5 9 号、同第 5, 8 2 7, 7 3 9 号)、ブラストサイジン (b s d 遺伝子)、真核細胞培養のための耐性遺伝子、ならびに E. c o l i および他の細菌もしくは原核生物における培養のためのアンピシリン、ゼオシン (Sh b l a 遺伝子)、ピューロマイシン (p a c 遺伝子)、ハイグロマイシン B (h y g B 遺伝子)、G 4 1 8 / ジェネティシン (n e o 遺伝子)、カナマイシン、スペクチノマイシン、ストレプトマイシン、カルベニシリン、ブレオマイシン、エリスロマイシン、ポリミキシン B または テトラサイクリン耐性遺伝子を含む (上記特許は、全体が参照により本明細書に援用される)。上記宿主細胞についての適切な培養培地および条件は、当技術分野において公知である。好適なベクターは、当業者には容易にわかる。宿主細胞へのベクター構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストラン媒介トランスフェクション、陽イオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染または他の公知の方法により果すことができる。そのような方法は、当技術分野において、例えば、S a m b r o o k、上掲、1 ~ 4 および 1 6 ~ 1 8 章；A u s u b e l、上掲、1、9、1 3、1 5、1 6 章に記載されている。

【0149】

発現ベクターは、本開示の組成物および方法により修飾された細胞の単離のための少なくとも 1 つの選択可能な細胞表面マーカを含むことが好ましいが、任意選択である。本開示の選択可能な細胞表面マーカは、細胞もしくは細胞のサブセットを細胞の規定された別のサブセットと区別する、表面タンパク質、糖タンパク質、またはタンパク質の群を含む。好ましくは、選択可能な細胞表面マーカは、本開示の組成物または方法により修飾された細胞を、本開示の組成物または方法により修飾されていない細胞と区別する。そのような細胞表面マーカは、例えば、これらに限定されないが、「表面抗原分類 (c l u s t e r o f d e s i g n a t i o n)」または「分類決定基 (c l a s s i f i c a t i o n d e t e r m i n a n t)」タンパク質 (「CD」と略記されることが多い)、例えば、切断型または完全長形態の CD 1 9、CD 2 7 1、CD 3 4、CD 2 2、CD 2 0、CD 3 3、CD 5 2、またはこれらの任意の組み合わせを含む。細胞表面マーカは、自殺遺伝子マーカ R Q R 8 (P h i l i p B ら、B l o o d. 2 0 1 4 年 8 月 2 1 日、1 2 4 巻 (8 号) 1 2 7 7 ~ 8 7 頁) をさらに含む。

【0150】

発現ベクターは、本開示の組成物および方法により修飾された細胞の単離のための少なくとも 1 つの選択可能な薬物耐性マーカを含むことが好ましいが、任意選択である。本開示の選択可能な薬物耐性マーカは、野生型または変異体 N e o、D H F R、T Y M S

、FRANCF、RAD51C、GCS、MDR1、ALDH1、NKX2.2またはこれらの任意の組み合わせを含むことがある。

【0151】

本開示の少なくとも1つのタンパク質足場を、融合タンパク質などの修飾形態で発現させることができ、タンパク質足場は、分泌シグナルだけでなく、さらなる異種機能性領域をも含むことができる。例えば、さらなるアミノ酸の領域、特に、荷電アミノ酸の領域を、タンパク質足場のN末端に付加させて、精製中またはその後の取り扱いおよび保管中の宿主細胞における安定性および存続を改善することができる。また、ペプチド部分を本開示のタンパク質足場に付加させて、精製を助長することができる。そのような領域は、タンパク質足場またはその少なくとも1つの断片の最終調製前に除去することができる。そのような方法は、Sambrook、上掲、17.29～17.42および18.1～18.74章；Ausubel、上掲、16、17および18章などの、多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている。

10

【0152】

当業者は、本開示のタンパク質をコードする核酸の発現に利用可能な多数の発現系を熟知している。あるいは、本開示の核酸を、本開示のタンパク質足場をコードする内在性DNAを含有する宿主細胞において（操作により）オンにすることにより、宿主細胞において発現させることができる。そのような方法は、例えば、全体が参照により本明細書に援用される米国特許第5,580,734号、同第5,641,670号、同第5,733,746号および同第5,733,761号に記載されているように、当技術分野において周知である。

20

【0153】

タンパク質足場、それらの指定部分または改変体の産生に有用な実例となる細胞培養物は、当技術分野において公知であるような細菌、酵母および哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞系は、細胞の単層の形態であることが多いが、哺乳動物細胞懸濁物またはバイオリアクターを使用することもできる。無傷のグリコシル化タンパク質を発現することができる多数の好適な宿主細胞株が、当技術分野において開発されており、それらは、COS-1（例えば、ATCC CRL 1650）、COS-7（例えば、ATCC CRL-1651）、HEK293、BHK21（例えば、ATCC CRL-10）、CHO（例えば、ATCC CRL 1610）およびBSC-1（例えば、ATCC CRL-26）細胞株、Cos-7細胞、CHO細胞、hep G2細胞、P3X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、293細胞、HeLa細胞などを含み、これらは、例えば、American Type Culture Collection、Manassas、Va.（www.atcc.org）から容易に入手することができる。好ましい宿主細胞は、骨髄腫およびリンパ腫細胞などの、リンパ系起源の細胞を含む。特に好ましい宿主細胞は、P3X63Ag8.653細胞（ATCC受託番号CRL-1580）およびSP2/0-Ag14細胞（ATCC受託番号CRL-1851）である。特に好ましい実施形態では、組換え細胞は、P3X63Ab8.653またはSP2/0-Ag14細胞である。

30

【0154】

これらの細胞の発現ベクターは、これらに限定されないが、複製起点、プロモーター（例えば、後期または早期SV40プロモーター、CMVプロモーター（米国特許第5,168,062号、同第5,385,839号）、HSV tkプロモーター、pgk（ホスグリセリン酸キナーゼ）プロモーター、EF-1アルファプロモーター（米国特許第5,266,491号）、少なくとも1つのヒトプロモーター）、エンハンサー、および／またはプロセシング情報部位、例えば、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位（例えば、SV40ラージT AgポリA付加部位）、ならびに転写終結配列などの、発現制御配列の1つまたは複数を含むことができる。例えば、Ausubelら、上掲；Sambrookら、上掲を参照されたい。本発明の核酸またはタンパク質の産生に有用な他の細胞は公知であり、および／またはAmerican Type

40

50

Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org)、もしくは他の公知の供給源もしくは商業的供給源から入手することができる。

【0155】

真核宿主細胞が用いられる場合、ポリアデニル化または転写終結配列が通常はベクターに組み込まれる。終結配列の例は、ウシ成長ホルモン遺伝子からのポリアデニル化配列である。転写物の正確なスプライシングのための配列も含めることができる。スプライシング配列の例は、SV40からのVP1イントロンである (Spragueら、J. Virol. 45巻: 773~781号 (1983年))。加えて、宿主細胞における複製を制御するための遺伝子配列を、当技術分野において公知であるように、ベクターに組み込むことができる。

10

【0156】

タンパク質足場の精製

タンパク質足場は、これらに限定されないが、プロテインA精製、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む、周知の方法により、組換え細胞培養物から回収することおよび精製することができる。高速液体クロマトグラフィー (「HPLC」) も精製に用いることができる。例えば、各々全体が参照により本明細書に援用される、Colligan、Current Protocols in Immunology、またはCurrent Protocols in Protein Science、John Wiley & Sons、NY、N. Y.、(1997~2001年)、例えば、1、4、6、8、9、10章を参照されたい。

20

【0157】

本開示のタンパク質足場は、自然精製産物、化学合成手順の産物、および原核生物または真核生物宿主 (例えば、E. coli、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含む) から組換え技術により産生された産物を含む。組換え産生手順に用いられる宿主に依存して、本開示のタンパク質足場は、グリコシル化されていてもよく、またはグリコシル化されていなくてもよい。そのような方法は、すべて全体が参照により本明細書に援用される、Sambrook、上掲、17. 37~17. 42節; Ausubel、上掲、10、12、13、16、18および20章; Colligan、Protein Science、上掲、12~14章などの、多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている。

30

【0158】

アミノ酸コード

本開示のタンパク質足場を構成するアミノ酸は、略記されることが多い。アミノ酸名は、当技術分野において十分承知されているように、その1文字コード、その3文字コード、名称、または3つのヌクレオチドコドンによりアミノ酸を指定することにより示すことができる (Alberts、B. ら、Molecular Biology of The Cell、第3版、Garland Publishing、Inc.、New York、1994年を参照されたい)。本開示のタンパク質足場は、本明細書に明記されるような、自然変異またはヒトによる操作のどちらかからの1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失または付加を含むことができる。機能に不可欠である、本開示のタンパク質足場中のアミノ酸は、当技術分野において公知の方法、例えば、部位特異的変異誘発またはアラニンスキャニング変異誘発により、同定することができる (例えば、Ausubel、上掲、8章、15頁; CunninghamおよびWells、Science 244巻: 1081~1085頁 (1989年))。後述の手順は、分子の残基ごとに単一のアラニン変異を導入する。次いで、結果として得られた変異体分子は、これらに限定されないが少なくとも1つの中和活性などの、生物活性について試験される。タンパク質足

40

50

場結合にとって重要な部位も、結晶化、核磁気共鳴または光アフィニティー標識 (photoaffinity labeling) などの、構造解析により同定することができる (Smithら、J. Mol. Biol. 224巻: 899~904頁 (1992年) および de Vosら、Science 255巻: 306~312頁 (1992年))。

【0159】

当業者には理解されるが、本発明は、本開示の少なくとも1つの生物活性タンパク質足場を含む。生物活性タンパク質足場は、天然 (非合成) の、内在性のまたは関連するおよび公知のタンパク質足場の比活性の少なくとも20%、30%または40%、および好ましくは少なくとも50%、60%または70%、および最も好ましくは少なくとも80%、90%もしくは95~99%のまたはそれより高い、比活性を有する。酵素活性および基質特異性の尺度をアッセイおよび定量する方法は、当業者に周知である。

【0160】

別の態様では、本開示は、有機部分の共有結合により修飾される、本明細書に記載のタンパク質足場および断片に関する。そのような修飾は、薬物動態特性が改善された (例えば、in vivo 血清半減期が増加した) タンパク質足場断片を生じさせることができる。有機部分は、直鎖状のもしくは分枝した親水性ポリマー基、脂肪酸基または脂肪酸エステル基でありうる。特定の実施形態では、親水性ポリマー基は、約800~約120,000ダルトンの分子量を有することができ、ポリアルカングリコール (例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール (PPG))、炭水化物ポリマー、アミノ酸ポリマーまたはポリビニルピロリドン、および脂肪酸または脂肪酸エステル基 (約8~約40個の炭素原子を含むことができる) でありうる。

【0161】

本開示の修飾タンパク質足場および断片は、抗体に直接または間接的に共有結合している1つまたは複数の有機部分を含むことができる。本開示のタンパク質足場または断片に結合している各有機部分は、独立して、親水性ポリマー基、脂肪酸基、または脂肪酸エステル基であることができる。本明細書で使用される用語「脂肪酸」は、モノカルボン酸およびジカルボン酸を包含する。「親水性ポリマー基」は、この用語が本明細書で使用される場合、オクタンよりも水においてより可溶性である有機ポリマーを指す。例えば、ポリリシンは、オクタンへの溶解度より水への溶解度のほうが高い。したがって、ポリリシンの共有結合により修飾されたタンパク質足場は、本開示により包含される。本開示のタンパク質足場を修飾するのに好適な親水性ポリマーは、直鎖状であってもよく、または分岐していてもよく、例えば、ポリアルカングリコール (例えば、PEG、モノメトキシポリエチレングリコール (mPEG)、PPGなど)、炭水化物 (例えば、デキストラン、セルロース、オリゴ糖類、多糖類など)、親水性アミノ酸のポリマー (例えば、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリアスパラギン酸エステル (polyaspartate) など)、ポリアルカンオキシド (例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシドなど)、およびポリビニルピロリドンを含みうる。好ましくは、本開示のタンパク質足場を修飾する親水性ポリマーは、別々の分子実体として、約800~約150,000ダルトンの分子量を有する。例えば、PEG₅₀₀₀ および PEG_{20,000} (ここでの下付文字は、ダルトンでのポリマーの平均分子量である) を使用することができる。親水性ポリマー基は、1~約6個のアルキル、脂肪酸または脂肪酸エステル基で置換されていてもよい。脂肪酸または脂肪酸エステル基で置換されている親水性ポリマーは、好適な方法を用いることにより調製することができる。例えば、アミン基を含むポリマーを、脂肪酸または脂肪酸エステルのカルボキシレートとカップリングさせ、脂肪酸または脂肪酸エステル上の活性化されたカルボキシレート (例えば、N, N-カルボニルジイミダゾールで活性化されたもの) をポリマー上のヒドロキシル基とカップリングさせることができる。

【0162】

本開示のタンパク質足場を修飾するのに好適な脂肪酸および脂肪酸エステルは、飽和されていてもよく、または1つもしくは複数の不飽和ユニットを含有してもよい。本開示の

タンパク質足場を修飾するのに好適である脂肪酸は、例えば、*n*-ドデカノエート (C 12、ラウレート)、*n*-テトラデカノエート (C 14、ミリスレート)、*n*-オクタデカノエート (C 18、ステアレート)、*n*-エイコサノエート (C 20、アラキデート)、*n*-ドコサノエート (C 22、ベヘネート)、*n*-トリアコンタノエート (C 30)、*n*-テトラコンタノエート (C 40)、シス- Δ 9-オクタデカノエート (C 18、オレアート)、全シス- Δ 5, 8, 11, 14-エイコサテトラエノエート (C 20、アラキドネート)、オクタン二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサン二酸などを含む。好適な脂肪酸エステルは、直鎖状のまたは分岐した低級アルキル基を含む、ジカルボン酸のモノエステルを含む。低級アルキル基は、1~約12個、好ましくは1~約6個の炭素原子を含むことができる。

10

【0163】

修飾されたタンパク質足場および断片は、好適な方法を使用して、例えば、1つまたは複数の修飾剤との反応により、調製することができる。「修飾剤」は、この用語が本明細書で使用される場合、活性化基を含む好適な有機基（例えば、親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル）を指す。「活性化基」は、適切な条件下で第2の化学基と反応することによって、修飾剤と第2の化学基の間に共有結合を形成することができる、化学的部分または官能基である。例えば、アミン反応性活性化基は、求電子基、例えば、トシレート、メシレート、ハロ（クロロ、ブロモ、フルオロ、ヨード）、*N*-ヒドロキシスクシンイミジルエステル (NHS) などを含む。チオールと反応することができる活性化基は、例えば、マレイミド、ヨードアセチル、アクリロリル、ピリジルジスルフィド、5-チオール-2-ニトロ安息香酸チオール (TNB-チオール) などを含む。アルデヒド官能基をアミン含有分子またはヒドラジド含有分子とカップリングさせることができ、アジド基は、三価亜リン酸基と反応してホスホルアミデートまたはホスホルイミド結合を形成することができる。活性化基を分子に導入するための好適な方法は、当技術分野において公知である（例えば、Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, Calif. (1996年)を参照されたい）。活性化基は、有機基（例えば、親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル）に、直接結合させることができ、またはリンカー部分、例えば、1個または複数の炭素原子が、酸素、窒素または硫黄などのヘテロ原子により置換されていてもよい、二価C1~C12基を介して結合させることができる。好適なリンカー部分は、例えば、テトラエチレングリコール、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-NH-(CH_2)_6-NH-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-$ 、および $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-NH-$ を含む。リンカー部分を含む修飾剤は、例えば、モノ-Boc-アルキルジアミン（例えば、モノ-Boc-エチレンジアミン、モノ-Boc-ジアミノヘキサン）を1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) の存在下で脂肪酸と反応させて、遊離アミンと脂肪酸カルボキシレート間にアミド結合を形成することにより、産生することができる。Boc保護基を産物からトリフルオロ酢酸 (TFA) での処理により除去して、第一級アミンを露出させることができ、この第一級アミンを、記載したような別のカルボキシレートとカップリングさせることができ、または無水マレイン酸と反応させ、結果として得られる産物を環化して、脂肪酸の活性化マレイミド誘導体を産生することができる。（例えば、Thompsonら、WO92/16221を参照されたい、この特許文献の全教示は参照により本明細書に援用される）。

20

30

40

【0164】

本開示の修飾されたタンパク質足場は、タンパク質足場または断片を修飾剤と反応させることにより産生させることができる。例えば、アミン反応性修飾剤、例えば、PEGのNHSエステルを用いることにより、部位特異的でない方法で、有機部分をタンパク質足場に結合させることができる。本開示のタンパク質足場の特異的部位に結合している有機部分を含む、修飾されたタンパク質足場および断片は、逆タンパク質分解 (reverse proteolysis) (Fischら、*Bioconjugate Chem.*, 3巻: 147~153頁 (1992年); Werlenら、*Bioconjugate*

50

Chem.、5巻：411～417頁（1994年）；Kumaranら、Protein Sci. 6巻（10号）：2233～2241頁（1997年）；Itohら、Bioorg. Chem.、24巻（1号）：59～68頁（1996年）；Capellasら、Biotechnol. Bioeng.、56巻（4号）：456～463頁（1997年）、およびHermanson、G. T.、Bioconjugate Techniques、Academic Press：San Diego、Calif.（1996年）に記載されている方法などの、好適な方法を使用して調製することができる。

【0165】

さらなる治療活性成分を含むタンパク質足場組成物

本開示のタンパク質足場化合物、組成物または組み合わせは、任意の好適な助剤（auxiliary）、例えば、これらに限定されないが、希釈剤、結合剤、安定剤、緩衝剤、塩、親油性溶媒、保存薬、アジュバントなどのうちの少なくとも1つをさらに含んでもよい。薬学的に許容される助剤が好ましい。そのような滅菌溶液の非限定的な例およびそれらを調製する方法は、当技術分野において周知であり、例えば、Gennaro編、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、Mack Publishing Co.（Easton、Pa.）1990年があるが、これに限定される。当技術分野において周知である、または本明細書に記載される、タンパク質足場、断片または改変体組成物の投与方式、溶解度および／または安定性にとって好適である、薬学的に許容される担体は、慣用的に選択することができる。

【0166】

本組成物に有用な薬学的賦形剤および添加剤は、これらに限定されないが、単独でまたは組み合わせで1～99.99重量または容量%を含む、単独でまたは組み合わせで存在する、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質および炭水化物（例えば、単糖、二糖、三糖、四糖およびオリゴ糖；誘導体化された糖、例えば、アルジトール、アルドン酸、エステル化された糖など、ならびに多糖類または糖ポリマーを含む、糖）を含む。例示的なタンパク質賦形剤は、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、組換えヒトアルブミン（rHA）、ゼラチン、カゼインなどを含む。緩衝能力の点でも機能することができる代表的なアミノ酸／タンパク質成分は、アラニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテームなどを含む。1つの好ましいアミノ酸は、グリシンである。

【0167】

本発明での使用に好適な炭水化物賦形剤は、例えば、単糖類、例えば、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボースなど；二糖類、例えば、ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオースなど；多糖類、例えば、ラフィノース、メレジトース（mellezitose）、マルトデキストリン、デキストラン、デンプンなど；ならびにアルジトール、例えば、マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトールソルビトール（グルシトール）、ミオイノシトールなどを含む。本発明での使用に好ましい炭水化物賦形剤は、マンニトール、トレハロースおよびラフィノースである。

【0168】

タンパク質足場組成物は、緩衝剤またはpH調節剤も含むことができ、通常は、緩衝剤は、有機酸または塩基から調製される塩である。代表的な緩衝剤は、有機酸塩、例えば、クエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、酢酸もしくはフタル酸の塩、Tris、トロメタミン塩酸塩、またはリン酸緩衝液を含む。本組成物での使用に好ましい緩衝剤は、有機酸塩、例えば、クエン酸塩である。

【0169】

加えて、本発明のタンパク質足場組成物は、ポリマー賦形剤／添加剤、例えば、ポリビニルピロリドン、フィコール（ポリマー糖）、デキストレート（dextrate）（例

えば、シクロデキストリン、例えば、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン）、ポリエチレングリコール、矯味矯臭剤、抗菌剤、甘味料、抗酸化剤、静電防止剤、界面活性剤（例えば、ポリソルベート、例えば「TWEEN 20」および「TWEEN 80」）、脂質（例えば、リン脂質、脂肪酸）、ステロイド（例えば、コレステロール）、およびキレート剤（例えば、EDTA）を含むことができる。

【0170】

本発明によるタンパク質足場、部分または改変体組成物での使用に好適なこれらのおよびさらなる公知の薬学的賦形剤および／または添加剤は、例えば、「Remington: The Science & Practice of Pharmacy」、第19版、Williams & Williams、(1995年)に、および「Physician's Desk Reference」、第52版、Medical Economics, Montvale, N. J. (1998年)に記載されているように、当技術分野において公知であり、前記参考文献の開示は、すべてが参照により本明細書に援用される。好ましい担体または賦形剤材料は、炭水化物（例えば、糖類およびアルジトール）および緩衝剤（例えば、クエン酸塩）またはポリマー作用物質である。例示的な担体分子は、関節内送達に有用でありうる、ムコ多糖類、ヒアルロン酸である。

【0171】

白血球搬出産物からのT細胞単離

白血球搬出産物または血液は、閉鎖系および標準的な方法を使用して臨床現場で被験体から採取することができる（例えば、COBE Spectra Apheresis System）。好ましくは、産物は、標準的な白血球搬出採取バッグにおいて標準的な病院または機関の白血球搬出手順に従って採取される。例えば、本開示の方法の好ましい実施形態では、白血球搬出中に通常使用されるものに加えてさらなる抗凝固剤または血液添加剤（ヘパリンなど）は含まれない。

【0172】

あるいは、白血球（WBC）／末梢血単核細胞（PBMC）（Biosafe Sepax 2（閉鎖／自動化）を使用）またはT細胞（CliniMACS（登録商標）Prodigy（閉鎖／自動化）を使用）は全血から直接単離することができる。しかしながら、特定の被験体（例えば、がんと診断および／または処置された被験体）では、WBC／PBMCの収量は、全血から単離された場合、白血球搬出によって単離された場合よりも著しく低いことがある。

【0173】

白血球搬出手順および／または直接細胞単離手順はいずれも本開示の任意の被験体を使用することができる。

【0174】

白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物は遮蔽された容器に充填され、臨床プロトコールでの使用が許可される標準的な病院または機関の血液採取手順に従って、制御された室温（+19℃から+25℃）に維持されるべきである。白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物は冷凍されるべきではない。

【0175】

白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物の細胞濃度は、輸送中、1 mL当たり 0.2×10^9 個の細胞を超えるべきではない。白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物の激しい混合は避けるべきである。

【0176】

白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物を、例えば終夜保管しなければならない場合、制御された室温に維持されなければならない（上記と同じ）。保管中、白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物の濃度は、1 mL当たり 0.2×10^9 個の細胞を超えてはならない。

【0177】

好ましくは、白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物の細胞は自己の血漿中で保管されるべきである。ある特定の実施形態では、白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物の細胞濃度が1mL当たり 0.2×10^9 個の細胞より高い場合、産物は自己の血漿で希釈されるべきである。

【0178】

好ましくは、白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物は、標識および分離手順を開始するときに24時間を過ぎてはならない。白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物は、閉鎖および／または自動化系を使用して細胞標識のために処理および／または調製することができる（例えば、CliniMACS Prodigy）。

10

【0179】

自動化系は、場合により、フィコレーション（ficulation）、および／または細胞産物（例えば、白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物）の洗浄によって、さらなるバフィーコート単離を行うことができる。

【0180】

閉鎖および／または自動化系を使用して、T細胞単離（例えば、白血球搬出産物、血液、WBC／PBMC組成物および／またはT細胞組成物から）のために細胞を調製および標識することができる。

20

【0181】

WBC／PBMCには直接ヌクレオフェクトしてもよいが（容易であり、追加のステップが省略される）、本開示の方法は、ヌクレオフェクションの前に最初にT細胞を単離するステップを含んでもよい。PBMCに直接ヌクレオフェクトする容易な戦略は、CARシグナル伝達によって媒介されるCAR＋細胞の選択的増殖を必要とし、それ自体は、T細胞を機能的に消耗させることによって産物のin vivo効率を直接低減する劣った増殖方法であることがわかっている。産物は、T細胞、NK細胞、NK T細胞、単球、またはこれらの任意の組み合わせを含むCAR＋細胞の不均一な組成物である可能性があり、患者間の産物の変動性を増加させ、投薬およびCRS管理をより困難にする。T細胞は、腫瘍抑制および殺滅において主要なエフェクターであると考えられるため、自己の産物の製造のためのT細胞単離が他のより不均一な組成物に優る顕著な利益をもたらすことがある。

30

【0182】

T細胞は、一方向性の標識手順で標識した細胞の濃縮または標識した細胞の枯渇によって、直接単離することができ、または二段階の標識手順で間接的に単離することができる。本開示の特定の濃縮戦略により、T細胞は細胞採取バッグに、非標識細胞（非標的細胞）は陰性画分バッグに採取することができる。本開示の濃縮戦略とは対照的に、非標識細胞（標的細胞）は細胞採取バッグに採取され、標識細胞（非標的細胞）は陰性画分バッグまたは非標的細胞バッグにそれぞれ採取される。選択試薬は、これに限定されないが、抗体でコーティングされたビーズを含みうる。抗体でコーティングされたビーズは、修飾および／または増殖ステップの前に除去されるか、または修飾および／または増殖ステップの前に細胞上に保持することができる。細胞マーカーの以下の非限定的な例の1つまたは複数を、T細胞の単離に使用することができる：CD3、CD4、CD8、CD25、抗ビオチン、CD1c、CD3／CD19、CD3／CD56、CD14、CD19、CD34、CD45RA、CD56、CD62L、CD133、CD137、CD271、CD304、IFN-ガンマ、TCRアルファ／ベータ、および／またはこれらの任意の組み合わせ。T細胞の単離の方法は、T細胞の単離に使用することができる以下の細胞マーカーの非限定的な例の1つまたは複수에特異的に結合するおよび／または検出可能に標識する1つまたは複数の試薬を含んでもよい：CD3、CD4、CD8、CD25、抗ビオチン、CD1c、CD3／CD19、CD3／CD56、CD14、CD19、CD34

40

50

、CD45RA、CD56、CD62L、CD133、CD137、CD271、CD304、IFN-ガンマ、TCRアルファ／ベータ、および／またはこれらの任意の組み合わせ。これらの試薬は、「医薬品および医薬部外品の製造管理および品質管理規則（Good Manufacturing Practices）」（「GMP」）グレードであってもなくてもよい。試薬は、これらに限定されないが、Thermo DynaBeadsおよびMiltenyi CliniMACS製品を含みうる。本開示のT細胞を単離する方法は、標識および／または単離するステップの複数回の反復を含んでもよい。本開示のT細胞を単離する方法の任意の時点で、望まない細胞および／または望まない細胞型は、望まない細胞および／または望まない細胞型の正のまたは負の選択ステップによって本開示のT細胞産物組成物から枯渇されることがある。本開示のT細胞産物組成物は、CD4、CD8、および／または別のT細胞マーカーを発現することができるさらなる細胞型を含有してもよい。

10

【0183】

T細胞のヌクレオフェクションの本開示の方法は、例えば、ヌクレオフェクション後にTCRシグナル伝達を介して単離ステップまたは選択的増殖ステップを含むWBC／PBMCの集団または組成物のT細胞のヌクレオフェクションのプロセスにより、T細胞単離のステップを除外してもよい。

【0184】

特定の細胞集団は、T細胞濃縮および／またはソーティング前または後に正または負の選択によって枯渇されてもよい。細胞産物組成物から枯渇されてもよい細胞組成物の例は、骨髄系細胞、CD25＋調節T細胞（T Reg）、樹状細胞、マクロファージ、赤血球、肥満細胞、ガンマデルタT細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラー（NK）様細胞（例えば、サイトカイン誘導性キラー（CIK）細胞）、誘導性ナチュラルキラー（iNK）T細胞、NK T細胞、B細胞、またはこれらの任意の組み合わせを含みうる。

20

【0185】

本開示のT細胞産物組成物は、CD4＋およびCD8＋T細胞を含んでもよい。CD4＋およびCD8＋T細胞は、単離または選択手順中に別々の採取バッグに単離することができる。CD4＋T細胞およびCD8＋T細胞はさらに別々に処置され、または特定の比で再構成（同じ組成物への組み合わせ）後に処置することができる。

30

【0186】

CD4＋T細胞およびCD8＋T細胞を再構成することができる特定の比は、使用された増殖技術の型および有効性、細胞培地、および／またはT細胞産物組成物の増殖に利用される増殖条件に依存することがある。可能なCD4＋：CD8＋比の例は、これらに限定されないが、50％：50％、60％：40％、40％：60％、75％：25％、および25％：75％を含む。

【0187】

CD8＋T細胞は腫瘍細胞殺滅に強力な能力を示すが、CD4＋T細胞はCD8＋T細胞増殖能力および機能を支持するのに必要な多くのサイトカインを提供する。正常なドナーから単離されたT細胞は、主にCD4＋であるため、T細胞産物組成物は、CD4＋：CD8＋比に関してin vitroで人工的に調節され、そうでなければin vivoで存在するであろうCD8＋T細胞に対するCD4＋T細胞の比を改善する。最適化された比は、自己T細胞産物組成物のex vivo増殖にも使用することができる。T細胞産物組成物の人工的に調節されたCD4＋：CD8＋比を考慮して、本開示の産物組成物が任意の天然に存在するT細胞の集団と著しく異なり、著しくより大きな利点を提供することができることに注意することが重要である。

40

【0188】

T細胞単離の好ましい方法は、手つかずの汎T細胞を産生する負の選択戦略を含みえ、生じるT細胞組成物は、操作されておらず、かつ天然に存在するT細胞の種類／比を含有するT細胞を含むことを意味する。

50

【0189】

正または負の選択に使用することができる試薬は、これらに限定されないが、磁性細胞分離ビーズを含む。磁性細胞分離ビーズは、本開示のT細胞単離方法の次のステップを行う前にCD4+T細胞、CD8+T細胞の選択された集団、またはCD4+とCD8+T細胞の両方の混合された集団から取り除かれても取り除かれなくても、または枯渇されても枯渇されなくてもよい。

【0190】

T細胞組成物およびT細胞産物組成物は、凍結保存、標準的なT細胞培養培地での保管、および／または遺伝子修飾のために調製されてもよい。

【0191】

T細胞組成物、T細胞産物組成物、未刺激のT細胞組成物、休止T細胞組成物またはこれらの任意の部分は、高い回復、生存度、表現型、および／または機能的能力を有するヒト細胞を保管および回復させるのに最適化された標準的な凍結保存方法を使用して凍結保存することができる。市販の凍結保存培地および／またはプロトコールを使用することができる。本開示の凍結保存方法は、冷凍関連毒性を減らすDMSOを含まない凍結保存剤（例えば、CryoSofree（商標）DMSO不含凍結保存培地）を含んでもよい。

【0192】

T細胞組成物、T細胞産物組成物、未刺激のT細胞組成物、休止T細胞組成物またはこれらの任意の部分は、培養培地中で保管できる。本開示のT細胞培養培地は、細胞保管、細胞遺伝子修飾、細胞表現型および／または細胞増殖に最適化することができる。本開示のT細胞培養培地は1つまたは複数の抗生物質を含んでもよい。細胞培養培地内への抗生物質の包含が、トランスフェクション効率および／またはヌクレオフェクションによる遺伝子修飾後の細胞収量を下げうるため、特定の抗生物質（またはそれらの組み合わせ）およびこれらのそれぞれの濃度は、最適なトランスフェクション効率および／またはヌクレオフェクションによる遺伝子修飾後の細胞収量のために変更することができる。

【0193】

本開示のT細胞培養培地は血清を含んでもよく、さらには、血清組成物および濃縮物は最適な細胞結果のために変更することができる。ヒトAB血清は、T細胞の培養のためにFBS／FCSよりも好ましい。なぜなら、本開示のT細胞培養培地での使用のために企図されているが、FBS／FCSは異種タンパク質を誘導し得るからである。血清は、培養物中のT細胞組成物の投与が意図される被験体の血液から単離されてもよく、したがって、本開示のT細胞培養培地は自己の血清を含んでもよい。無血清培地または代用血清も、本開示のT細胞培養培地で使用することができる。本開示のT細胞培養培地および方法のある特定の実施形態では、無血清培地または代用血清は、これらに限定されないが、より優れた生存度を有し、より高い効率でヌクレオフェクトされ、ヌクレオフェクション後により優れた生存度を示し、より望ましい細胞表現型、および／または増殖技術の追加の際に、より優れた／速い増殖を示す、より健康な細胞を含む、培地への異種血清の補足に優る利点を提供することができる。

【0194】

T細胞培養培地は市販の細胞増殖培地を含んでもよい。例示的な市販の細胞増殖培地は、これらに限定されないが、PBS、HBSS、OptiMEM、DMEM、RPMI 1640、AIM-V、X-VIVO 15、CellGro DC培地、CTS Optimizer T Cell Expansion SFM、TexMACS培地、PRIME-XV T Cell Expansion培地、ImmunoCult-XF T Cell Expansion培地またはこれらの任意の組み合わせを含む。

【0195】

T細胞組成物、T細胞産物組成物、未刺激のT細胞組成物、休止T細胞組成物またはこれらの任意の部分は、遺伝子修飾のために調製することができる。遺伝子修飾のためのT細胞組成物、T細胞産物組成物、未刺激のT細胞組成物、休止T細胞組成物またはこれらの任意の部分の調製は、細胞洗浄および／または所望のヌクレオフェクション緩衝液への

10

20

30

40

50

再懸濁を含んでもよい。凍結保存T細胞組成物は、ヌクレオフェクションによる遺伝子修飾のために解凍および調製することができる。凍結保存細胞は、標準的なまたは公知のプロトコールに従って解凍することができる。凍結保存細胞の解凍および調製を最適化して、より優れた生存度を有し、より高い効率でヌクレオフェクトされ、ヌクレオフェクション後により優れた生存度を示し、より望ましい細胞表現型、および／または増殖技術の追加の際に、より優れた／速い増殖を示す細胞を産生することができる。例えば、Grifols Albutein (25%ヒトアルブミン)を解凍および／または調製プロセスで使用する事ができる。

【0196】

自己T細胞産物組成物の遺伝子修飾

T細胞組成物、T細胞産物組成物、未刺激のT細胞組成物、休止T細胞組成物またはこれらの任意の部分は、例えば、エレクトロポレーションなどのヌクレオフェクション戦略を使用して遺伝子修飾することができる。ヌクレオフェクトされる細胞の総数、ヌクレオフェクション反応の総容積、および試料の調製の正確なタイミングを最適化して、より優れた生存度を有し、より高い効率でヌクレオフェクトされ、ヌクレオフェクション後により優れた生存度を示し、より望ましい細胞表現型、および／または増殖技術の追加の際に、より優れた／速い増殖を示す細胞を産生することができる。

【0197】

ヌクレオフェクションおよび／またはエレクトロポレーションは、例えば、Lonza Amaxa、MaxCyte Pulse Agile、Harvard Apparatus BTX、および／またはInvitrogen Neonを使用して達成することができる。これらに限定されないが、プラスチックポリマー電極を含む非金属電極系がヌクレオフェクションに好ましい場合がある。

【0198】

ヌクレオフェクションによる遺伝子修飾の前に、T細胞組成物、T細胞産物組成物、未刺激のT細胞組成物、休止T細胞組成物またはこれらの任意の部分は、ヌクレオフェクション緩衝液に再懸濁されてもよい。本開示のヌクレオフェクション緩衝液は市販のヌクレオフェクション緩衝液を含む。本開示のヌクレオフェクション緩衝液を最適化して、より優れた生存度を有し、より高い効率でヌクレオフェクトされ、ヌクレオフェクション後により優れた生存度を示し、より望ましい細胞表現型、および／または増殖技術の追加の際に、より優れた／速い増殖を示す細胞を産生することができる。本開示のヌクレオフェクション緩衝液は、これらに限定されないが、PBS、HBSS、OptiMEM、BTX press、Amaxa Nucleofector、ヒトT細胞ヌクレオフェクション緩衝液およびこれらの任意の組み合わせを含む。本開示のヌクレオフェクション緩衝液は、1つまたは複数のさらなる因子を含み、より優れた生存度を有し、より高い効率でヌクレオフェクトされ、ヌクレオフェクション後により優れた生存度を示し、より望ましい細胞表現型、および／または増殖技術の追加の際に、より優れた／速い増殖を示す細胞を産生することができる。例示的なさらなる因子は、これらに限定されないが、組換えヒトサイトカイン、ケモカイン、インターロイキンおよびこれらの任意の組み合わせを含む。例示的なサイトカイン、ケモカイン、およびインターロイキンは、これらに限定されないが、IL2、IL7、IL12、IL15、IL21、IL1、IL3、IL4、IL5、IL6、IL8、CXCL8、IL9、IL10、IL11、IL13、IL14、IL16、IL17、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL35、IL36、GM-CSF、IFN-ガンマ、IL-1アルファ／IL-1F1、IL-1ベータ／IL-1F2、IL-12 p70、IL-12／IL-35 p35、IL-13、IL-17／IL-17A、IL-17A／Fヘテロ二量体、IL-17F、IL-18／IL-1F4、IL-23、IL-24、IL-32、IL-32ベータ、IL-32ガンマ、IL-33、LAP (TGF-ベータ1)、リンホトキシン-アルファ／TNF-ベータ、TGF-ベータ、TNF-アルファ、TRANCE／TNF

10

20

30

40

50

S F 1 1 / R A N K L およびこれらの任意の組み合わせを含む。例示的なさらなる因子は、これらに限定されないが、塩、無機物、代謝物またはこれらの任意の組み合わせを含む。例示的な塩、無機物、および代謝物は、これらに限定されないが、H E P E S、ニコチンアミド、ヘパリン、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、MEM 非必須アミノ酸溶液、アスコルビン酸、ヌクレオシド、F B S / F C S、ヒト血清、代用血清、抗生物質、p H 調節剤、アール塩、2-メルカプトエタノール、ヒトトランスフェリン、組換えヒトインスリン、ヒト血清アルブミン、N u c l e o f e c t o r P L U S S u p p l e m e n t、K C L、M g C l 2、N a 2 H P O 4、N A H 2 P O 4、ラクトビオン酸ナトリウム、マンニトール、コハク酸ナトリウム、塩化ナトリウム、C I N a、グルコース、C a (N O 3) 2、T r i s / H C l、K 2 H P O 4、K H 2 P O 4、ポリエチレンイミン、ポリエチレングリコール、ポロクサマー 1 8 8、ポロクサマー 1 8 1、ポロクサマー 4 0 7、ポリビニルピロリドン、P o p 3 1 3、クラウン-5、またはこれらの任意の組み合わせを含む。例示的なさらなる因子は、これらに限定されないが、P B S、H B S S、O p t i M E M、D M E M、R P M I 1 6 4 0、A I M - V、X - V I V O 1 5、C e l l G r o D C 培地、C T S O p T i m i z e r T C e l l E x p a n s i o n S F M、T e x M A C S 培地、P R I M E - X V T C e l l E x p a n s i o n 培地、I m m u n o C u l t - X F T C e l l E x p a n s i o n 培地およびこれらの任意の組み合わせなどの培地を含む。例示的なさらなる因子は、これらに限定されないが、細胞の D N A 感知、代謝、分化、シグナル伝達、アポトーシス経路およびこれらの組み合わせの阻害剤を含む。例示的な阻害剤は、これらに限定されないが、T L R 9、M y D 8 8、I R A K、T R A F 6、T R A F 3、I R F - 7、N F - K B、1 型インターフェロン、炎症促進性サイトカイン、c G A S、S T I N G、S e c 5、T B K 1、I R F - 3、R N A p o l I I I、R I G - 1、I P S - 1、F A D D、R I P 1、T R A F 3、A I M 2、A S C、カスパーゼ 1、P r o - I L 1 B、P I 3 K、A k t、W n t 3 A の阻害剤、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 β (G S K - 3 β) の阻害剤 (例えば、T W S 1 1 9)、バフィロマイシン、クロロキン、キナクリン、A C - Y V A D - C M K、Z - V A D - F M K、Z - I E T D - F M K およびこれらの任意の組み合わせを含む。例示的なさらなる因子は、これらに限定されないが、細胞送達を増強する、核送達または輸送を増強する、核への核酸の助長された輸送を増強する、染色体上 (e p i - c h r o m o s o m a l) の核酸の分解を増強する、および/または D N A 媒介毒性を減少させるように、1 つまたは複数の核酸を修飾または安定化する試薬を含む。1 つまたは複数の核酸を修飾または安定化する例示的な試薬は、これらに限定されないが、p H 調整剤、D N A 結合タンパク質、脂質、リン脂質、C a P O 4、N L S 配列を有するもしくは有さない正味中性電荷 D N A 結合ペプチド、T R E X 1 酵素、およびこれらの任意の組み合わせを含む。

【0199】

トランスポゾンおよびトランスポザーゼを含む転位試薬は、ヌクレオフェクション緩衝液への細胞の添加前、同時、または後に本開示のヌクレオフェクション反応に添加することができる (任意選択で、ヌクレオフェクション反応バイアルまたはキュベット内に含有される)。本開示のトランスポゾンは、プラスミド D N A、線状化プラスミド D N A、P C R 産物、D O G G Y B O N E (商標) D N A、m R N A 鋳型、一本鎖または二本鎖 D N A、タンパク質-核酸組み合わせ、またはこれらの任意の組み合わせを含んでもよい。本開示のトランスポゾンは、1 つまたは複数の T T A A 部位、1 つまたは複数の末端逆位配列 (I T R)、1 つまたは複数の末端反復配列 (L T R)、1 つまたは複数のインスレーター、1 つまたは複数のプロモーター、1 つまたは複数の完全長もしくは切断された遺伝子、1 つまたは複数のポリ A シグナル、1 つまたは複数の自己切断 2 A ペプチド切断部位、1 つまたは複数の配列内リボソーム進入部位 (I R E S)、1 つまたは複数のエンハンサー、1 つまたは複数のレギュレーター、1 つまたは複数の複製起点、およびこれらの任意の組み合わせをコードする、1 つまたは複数の配列を含んでもよい。

【0200】

本開示のトランスポゾン、1つまたは複数の完全長もしくは切断された遺伝子をコードする1つまたは複数の配列を含んでもよい。本開示のトランスポゾンによって導入された完全長および／または切断された遺伝子は、シグナルペプチド、Centyrin、一本鎖可変断片(s c F v)、ヒンジ、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、キメラ抗原受容体(CAR)、キメラT細胞受容体(CAR-T)、CAR Ty rin (Centyrinを含むCAR-T)、受容体、リガンド、サイトカイン、薬物耐性遺伝子、腫瘍抗原、同種または自己抗原、酵素、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、蛍光タンパク質、変異タンパク質またはこれらの任意の組み合わせの1つまたは複数を含んでもよい。

【0201】

本開示のトランスポゾンは水、TAE、TBE、PBS、HBSS、培地、本開示のさらなる因子、またはこれらの任意の組み合わせ中で調製されてもよい。

10

【0202】

本開示のトランスポゾンは、臨床的安全性を最適化および／または製造可能性を改善するために設計することができる。非限定的な例としては、本開示のトランスポゾンは、不必要な配列または領域を除去するおよび／または非抗生物質の選択マーカーを含むことによって、臨床的安全性を最適化および／または製造可能性を改善するために設計することができる。本開示のトランスポゾンはGMPグレードであってもなくてもよい。

【0203】

本開示のトランスポザーゼ酵素は、プラスミドDNA、mRNA、タンパク質、タンパク質-核酸組み合わせまたはこれらの任意の組み合わせの1つまたは複数の配列によってコードされてもよい。

20

【0204】

本開示のトランスポザーゼ酵素は、水、TAE、TBE、PBS、HBSS、培地、本開示のさらなる因子またはこれらの任意の組み合わせ中で調製されてもよい。本開示のトランスポザーゼ酵素またはそれらをコードもしくは送達する配列／構築物はGMPグレードであってもなくてもよい。

【0205】

本開示のトランスポゾンおよびトランスポザーゼ酵素は任意の手段によって細胞に送達することができる。

【0206】

本開示の組成物および方法は、本開示のトランスポゾンおよび／またはトランスポザーゼのプラスミドDNA(pDNA)による細胞への送達を含むが、送達のためのプラスミドの使用により、トランスポゾンおよび／またはトランスポザーゼの細胞の染色体DNAへの組込みが可能になり、継続的なトランスポザーゼ発現をもたらすことができる。したがって、本開示のトランスポゾンおよび／またはトランスポザーゼ酵素は、染色体組込みのあらゆる可能性を排除するために、mRNAまたはタンパク質のいずれかとして細胞に送達することができる。

30

【0207】

本開示のトランスポゾンおよびトランスポザーゼは、トランスポゾンおよび／またはトランスポザーゼをヌクレオフェクション反応に導入する前に単独でまたは互いに組み合わせて事前にインキュベートされてもよい。トランスポゾンおよびトランスポザーゼのそれぞれの絶対量、ならびに相対量、例えばトランスポザーゼに対するトランスポゾンの比は最適化することができる。

40

【0208】

任意選択でバイアルまたはキュベット中でのヌクレオフェクション反応の調製に続いて、反応はヌクレオフェクター(nucleofector)装置にロードされ、製造業者のプロトコールにしたがって電気パルスの送達のために活性化することができる。本開示のトランスポゾンおよび／またはトランスポザーゼ(または本開示のトランスポゾンおよび／またはトランスポザーゼをコードする配列)の細胞への送達に使用される電気パルス条件は、増強された生存度、より高いヌクレオフェクション効率、ヌクレオフェクション

50

後のより優れた生存度、望ましい細胞表現型、および／または増殖技術の追加の際に、より優れた／速い増殖を示す細胞を産生するために最適化することができる。Am a x a n u c l e o f e c t o r 技術を使用する場合、Am a x a 2 B または 4 D スクレオフェクターのための様々なスクレオフェクションプログラムの各々が企図される。

【0209】

本開示のスクレオフェクション反応に続いて、細胞は細胞培地に穏やかに添加することができる。例えば、T細胞がスクレオフェクション反応を受ける場合、T細胞をT細胞培地に添加することができる。本開示のスクレオフェクション後の細胞培地は、いずれか1つまたは複数の市販の培地を含みうる。本開示のスクレオフェクション後の細胞培地（本開示のスクレオフェクション後のT細胞培地を含む）は、より優れた生存度、より高いスクレオフェクション効率を有し、スクレオフェクション後により優れた生存度を示し、より望ましい細胞表現型を示し、および／または増殖技術の追加の際に、より優れた／速い増殖を示す細胞を産生するように最適化することができる。本開示のスクレオフェクション後の細胞培地（本開示のスクレオフェクション後のT細胞培地を含む）は、PBS、HBSS、Opt i MEM、DMEM、RPMI 1640、AIM-V、X-VIVO 15、Cell Gro DC培地、CTS OpT i m i z e r T Cell Exp a n s i o n SFM、TexMACS培地、PRIME-XV T Cell Exp a n s i o n培地、ImmunoCult-XF T Cell Exp a n s i o n培地およびこれらの任意の組み合わせを含んでもよい。本開示のスクレオフェクション後の細胞培地（本開示のスクレオフェクション後のT細胞培地を含む）は、本開示の1つまたは複数のさらなる因子を含み、生存度、スクレオフェクション効率、スクレオフェクション後の生存度、細胞表現型、および／または増殖技術の追加の際に、より優れた／速い増殖を増強しうる。例示的なさらなる因子は、これらに限定されないが、組換えヒトサイトカイン、ケモカイン、インターロイキンおよびこれらの任意の組み合わせを含む。例示的なサイトカイン、ケモカイン、およびインターロイキンは、これらに限定されないが、IL2、IL7、IL12、IL15、IL21、IL1、IL3、IL4、IL5、IL6、IL8、CXCL8、IL9、IL10、IL11、IL13、IL14、IL16、IL17、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL35、IL36、GM-CSF、IFN-ガンマ、IL-1アルファ／IL-1F1、IL-1ベータ／IL-1F2、IL-12 p70、IL-12／IL-35 p35、IL-13、IL-17／IL-17A、IL-17A／Fヘテロ二量体、IL-17F、IL-18／IL-1F4、IL-23、IL-24、IL-32、IL-32ベータ、IL-32ガンマ、IL-33、LAP（TGF-ベータ1）、リンホトキシナーアルファ／TNF-ベータ、TGF-ベータ、TNF-アルファ、TRANCE／TNFSF11／RANK Lおよびこれらの任意の組み合わせを含む。例示的なさらなる因子としては、これらに限定されないが、塩、無機物、代謝物またはこれらの任意の組み合わせを含む。例示的な塩、無機物、および代謝物は、これらに限定されないが、HEPES、ニコチンアミド、ヘパリン、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、MEM非必須アミノ酸溶液、アスコルビン酸、スクレオシド、FBS／FCS、ヒト血清、代用血清、抗生物質、pH調節剤、アール塩、2-メルカプトエタノール、ヒトトランスフェリン、組換えヒトインスリン、ヒト血清アルブミン、Nucleofector PLUS Supplement、KCL、MgCl2、Na2HPO4、NaH2PO4、ラクトビオン酸ナトリウム、マンニトール、コハク酸ナトリウム、塩化ナトリウム、CINa、グルコース、Ca(NO3)2、Tris／HCl、K2HPO4、KH2PO4、ポリエチレニミン、ポリエチレングリコール、ポロクサマー188、ポロクサマー181、ポロクサマー407、ポリビニルピロリドン、Pop313、クラウン-5、またはこれらの任意の組み合わせを含む。例示的なさらなる因子は、これらに限定されないが、PBS、HBSS、Opt i MEM、DMEM、RPMI 1640、AIM-V、X-VIVO 15、Cell Gro DC培地、CTS OpT i m i z e r T Cell Exp a n s

10

20

30

40

50

ion SFM、TexMACS培地、PRIME-XV T Cell Expansion培地、ImmunoCult-XF T Cell Expansion培地およびこれらの任意の組み合わせなどの培地を含む。例示的なさらなる因子は、これらに限定されないが、細胞のDNA感知、代謝、分化、シグナル伝達、アポトーシス経路およびこれらの組み合わせの阻害剤を含む。例示的な阻害剤は、これらに限定されないが、TLR9、MyD88、IRAK、TRAF6、TRAF3、IRF-7、NF-κB、1型インターフェロン、炎症促進性サイトカイン、cGAS、STING、Sec5、TBK1、IRF-3、RNA pol III、RIG-1、IPS-1、FADD、RIP1、TRAF3、AIM2、ASC、カスパーゼ1、Pro-IL1β、PI3K、Akt、Wnt3Aの阻害剤、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3β (GSK-3β)の阻害剤（例えば、TWS119）、バフィロマイシン、クロロキン、キナクリン、AC-YVAD-CMK、Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMKおよびこれらの任意の組み合わせを含む。例示的なさらなる因子は、これらに限定されないが、細胞送達を増強する、核送達または輸送を増強する、核への核酸の助長された輸送を増強する、染色体上の核酸の分解を増強する、および／またはDNA媒介毒性を減少させるように、1つまたは複数の核酸を修飾または安定化する試薬を含む。1つまたは複数の核酸を修飾または安定化する例示的な試薬は、これらに限定されないが、pH調整剤、DNA結合タンパク質、脂質、リン脂質、CaPO₄、NLS配列を有するもしくは有さない正味中性電荷DNA結合ペプチド、TREX1酵素、およびこれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0210】

20

本開示のヌクレオフェクション後の細胞培地（本開示のヌクレオフェクション後のT細胞培地を含む）は、室温で使用され、または例えば、32℃から37℃（端点を含む）の間に事前に温められてもよい。本開示のヌクレオフェクション後の細胞培地（本開示のヌクレオフェクション後のT細胞培地を含む）は、細胞の生存度および／または本開示のトランスポゾンまたはそれらの部分の発現を維持または増強する任意の温度に事前に温められてもよい。

【0211】

本開示のヌクレオフェクション後の細胞培地（本開示のヌクレオフェクション後のT細胞培地を含む）は、組織培養フラスコまたはディッシュ、G-Rexフラスコ、バイオリアクターもしくは細胞培養バッグ、または任意の他の標準的な容器中に含有されてもよい。本開示のヌクレオフェクション後の細胞培養物（本開示のヌクレオフェクション後のT細胞培養物を含む）は静置しておいてもよく、または代わりにそれらを摂動してもよい（例えば、揺する、旋回する、または振盪する）。

30

【0212】

ヌクレオフェクション後の細胞培養物は、遺伝子修飾細胞を含んでもよい。ヌクレオフェクション後のT細胞培養物は遺伝子修飾T細胞を含んでもよい。本開示の遺伝子修飾細胞は、規定した期間休止されるか、または例えばT Cell Expander技術の追加により、増殖を刺激されるかのいずれかであってもよい。ある特定の実施形態では、本開示の遺伝子修飾細胞は、規定した期間休止されるか、または例えばT Cell Expander技術の追加により、増殖を直ちに刺激されるかのいずれかであってもよい。本開示の遺伝子修飾細胞は、順応するのに十分な時間、転位が生じるのに十分な時間、および／または正もしくは負の選択のための十分な時間が与えられるように休止され得、増強された生存度、より高いヌクレオフェクション効率、ヌクレオフェクション後のより優れた生存度、望ましい細胞表現型、および／または増殖技術の追加の際に、より優れた／速い増殖を示す細胞を生じてもよい。本開示の遺伝子修飾細胞は、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間またはそれより長い時間にわたって休止されてもよい。ある特定の実施形態では、本開示の遺伝子修飾細胞は、例えば終夜にわたって休止されてもよい。特定の態様では、終夜は約12時間である。本開示の遺伝子修飾細胞は、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日また

40

50

はそれより長い日数にわたって休止されてもよい。

【0213】

本開示の遺伝子修飾細胞は、ヌクレオフェクション反応後、かつエキスパンダー (expander) 技術の追加前に選択することができる。遺伝子修飾細胞の最適な選択のため、細胞は少なくとも2〜14日間ヌクレオフェクション後の細胞培地中で休止され、修飾細胞の同定 (例えば、非修飾細胞から修飾細胞の区別) を助長することができる。

【0214】

本開示のトランスポゾンのヌクレオフェクションが成功した場合、ヌクレオフェクション後24時間の早期に、CAR/CARTyrinおよび本開示の選択マーカーの発現は、修飾T細胞で検出可能でありうる。トランスポゾンの染色体上の発現により、選択マーカーのみの発現は、非修飾T細胞 (トランスポゾンの組み込みが成功しなかった細胞) から修飾T細胞 (トランスポゾンの組み込みが成功した細胞) を区別できない。トランスポゾンの染色体上の発現が、選択マーカーによる修飾細胞の検出をあいまいにする場合、ヌクレオフェクトされた細胞 (修飾および非修飾細胞の両方) は、一定期間 (例えば2〜14日間) 休止され、細胞の発現を終わらせ、または全ての染色体上のトランスポゾン発現を喪失させることができる。この延長された休止期に続いて、修飾T細胞のみが選択マーカーの発現が陽性なままであるはずである。この延長された休止期の長さは、各ヌクレオフェクション反応および選択プロセスに最適化されてもよい。トランスポゾンの染色体上の発現が、選択マーカーによる修飾細胞の検出をあいまいにする場合、選択はこの延長された休止期なしで行われてもよいが、追加の選択ステップが後の時点で含まれうる (例えば、増殖ステージ中または後のいずれか)。

【0215】

本開示の遺伝子修飾細胞の選択は、任意の手段によって行われてもよい。本開示の方法のある特定の実施形態では、本開示の遺伝子修飾細胞の選択は、特定の選択マーカーを発現する細胞を単離するステップによって行うことができる。本開示の選択マーカーは、トランスポゾンの1つまたは複数の配列によってコードされていてもよい。本開示の選択マーカーは、転位の成功の結果として修飾細胞によって発現することができる (すなわち、トランスポゾンの1つまたは複数の配列によってコードされていない)。ある特定の実施形態では、本開示の遺伝子修飾細胞は、ヌクレオフェクション後の細胞培地の有害な化合物に対する耐性を付与する選択マーカーを含有する。有害な化合物は、例えば、修飾細胞に選択マーカーによって付与された耐性が無く、細胞死をもたらす抗生物質または薬物を含んでもよい。例示的な選択マーカーは、これらに限定されないが、以下の遺伝子: neo、DHFR、TYMS、ALDH、MDR1、MGMT、FANCF、RAD51C、GCS、およびNKX2.2の1つまたは複数の野生型 (WT) または変異体形態を含む。例示的な選択マーカーは、これらに限定されないが、表面発現選択マーカーまたは表面発現タグを含み、それぞれAbでコーティングされた磁性ビーズ技術またはカラム選択によって標的化することができる。タンパク質精製に使用されるものなどの切断可能なタグは、効率的なカラム選択、洗浄、および溶出のために本開示の選択マーカーに加えることができる。ある特定の実施形態では、本開示の選択マーカーは、天然には修飾細胞 (修飾T細胞を含む) によって発現されず、したがって、修飾細胞の物理的単離に有用であることがある (例えば、細胞ソーティング技術による)。本開示の例示的な選択マーカーは、天然には修飾細胞 (修飾T細胞を含む) によって発現されず、これらに限定されないが、CD271、CD19CD52、CD34、RQR8、CD22、CD20、CD33およびこれらの任意の組み合わせの完全長、変異または切断形態を含む。

【0216】

本開示の遺伝子修飾細胞は、ヌクレオフェクション反応に続いて選択的に増殖させることができる。ある特定の実施形態では、CAR/CARTyrinを含む修飾T細胞は、CAR/CARTyrin刺激によって選択的に増殖させることができる。CAR/CARTyrinを含む修飾T細胞は、標的で覆われた試薬 (例えば、標的を発現する腫瘍株もしくは正常細胞株または標的において覆われているエキスパンダービーズ) との接触に

よって刺激することができる。あるいは、CAR／CARTy r i nを含む修飾T細胞は、照射された腫瘍細胞、照射された同種異系の正常細胞、照射された自己のP B M Cとの接触によって刺激することができる。刺激に使用された標的発現細胞による本開示の細胞産物組成物の混入を最小限にするため、例えば、細胞産物組成物が被験体に直接投与される場合、刺激はCAR／CARTy r i n標的タンパク質によってコーティングされたエキスパンダービーズを使用して行うことができる。CAR／CARTy r i n刺激によるCAR／CARTy r i nを含む修飾T細胞の選択的増殖は、修飾T細胞を機能的に消耗させることを避けるように最適化することができる。

【0217】

本開示の選択された遺伝子修飾細胞は、凍結保存され、規定した期間休止され、またはC e l l E x p a n d e r技術の追加によって増殖のために刺激されうる。本開示の選択された遺伝子修飾細胞は、凍結保存され、規定した期間休止され、またはC e l l E x p a n d e r技術の追加によって増殖のために直ちに刺激されうる。選択された遺伝子修飾細胞がT細胞である場合、T細胞はT－C e l l E x p a n d e r技術の追加によって増殖のために刺激することができる。本開示の選択された遺伝子修飾細胞は、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間またはそれより長い時間にわたって休止されてもよい。ある特定の実施形態では、本開示の選択された遺伝子修飾細胞は、例えば終夜、休止されてもよい。ある特定の態様では、終夜は約12時間である。本開示の選択された遺伝子修飾細胞は、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日またはそれより長い日数にわたって休止されてもよい。選択された本開示の遺伝子修飾細胞は、任意の時間休止されてもよく、増強された生存度、より高いヌクレオフェクション効率、ヌクレオフェクション後のより優れた生存度、望ましい細胞表現型、および／または増殖技術の追加の際に、より優れた／速い増殖を示す細胞を生じる。

【0218】

選択された遺伝子修飾細胞（本開示の選択された遺伝子修飾T細胞を含む）は、高い回復、生存度、表現型、および／または機能的能力を有するヒト細胞を保管および／または回復させるために最適化することができる任意の標準的な凍結保存方法を使用して凍結保存することができる。本開示の凍結保存方法は、市販の凍結保存培地および／またはプロトコールを含んでもよい。

【0219】

選択された遺伝子修飾細胞（本開示の選択された遺伝子修飾T細胞を含む）の転位効率は任意の手段によって評価することができる。例えば、エキスパンダー技術の適用前に、選択された遺伝子修飾細胞（本開示の選択された遺伝子修飾T細胞を含む）によるトランスポゾンの発現は、蛍光標示細胞ソーティング（F A C S）によって測定することができる。選択された遺伝子修飾細胞（本開示の選択された遺伝子修飾T細胞を含む）の転位効率の決定は、トランスポゾン（例えば、CAR）を発現する選択された細胞の百分率を決定するステップを含んでもよい。あるいは、または加えて、T細胞の純度、トランスポゾン発現（例えばCAR発現）の平均蛍光強度（M F I）、CARリガンドを発現する標的細胞の脱顆粒および／または殺滅を媒介するCAR（トランスポゾンに送達される）の能力、および／または選択された遺伝子修飾細胞（本開示の選択された遺伝子修飾T細胞を含む）の表現型は、任意の手段によって評価することができる。

【0220】

本開示の細胞産物組成物は、特定のリリース（release）基準に合う際に被験体への投与のためにリリースすることができる。例示的なリリース基準は、これらに限定されないが、細胞表面上にCARを検出可能なレベルで発現する修飾、選択および／または増殖されたT細胞の特定の百分率を含むうる。

【0221】

自己T細胞産物組成物の遺伝子修飾

本開示の遺伝子修飾細胞（遺伝子修飾T細胞を含む）は、エキスパンダー技術を使用して増殖させることができる。本開示のエキスパンダー技術は、市販のエキスパンダー技術を含んでもよい。本開示の例示的なエキスパンダー技術は、TCRを介する本開示の遺伝子修飾T細胞の刺激を含む。本開示の遺伝子修飾T細胞の刺激のための全ての手段が企図されているが、TCRを介する本開示の遺伝子修飾T細胞の刺激が好ましい方法であり、優れたレベルの殺滅能力を有する産物を産生する。

【0222】

TCRを介して本開示の遺伝子修飾T細胞を刺激するため、Thermo Expander DynaBeadsをビーズ対T細胞比3:1で使うことができる。エキスパンダービーズが生分解性ではない場合、ビーズはエキスパンダー組成物から除去されてもよい。例えば、ビーズは約5日後にエキスパンダー組成物から除去されてもよい。TCRを介して本開示の遺伝子修飾T細胞を刺激するため、Miltenyi T Cell Activation/Expansion試薬が使用されてもよい。TCRを介して本開示の遺伝子修飾T細胞を刺激するため、StemCell TechnologiesのImmunoCult Human CD3/CD28またはCD3/CD28/CD2 T Cell Activator試薬が使用されてもよい。この技術は、可溶性の四量体抗体複合体が期間後に分解され、プロセスからの除去を必要としないため好ましいことがある。

【0223】

人工抗原提示細胞（APC）は、標的抗原を共発現するように操作され、本開示のTCRおよび／またはCARにより本開示の細胞またはT細胞を刺激するために使用されてもよい。人工APCは腫瘍細胞株を含んでもよく、または腫瘍細胞株に由来してもよく（例えば、不死化骨髓性白血病株K562を含む）、複数の共刺激分子または技術（例えばCD28、4-1BBL、CD64、mBIL-21、mBIL-15、CAR標的分子など）を共発現するように操作されてもよい。本開示の人工APCが共刺激分子と組み合わせられる場合、望ましくない表現型および機能的能力、すなわち最終分化したエフェクターT細胞の発生または出現を防ぐために条件は最適化されてもよい。

【0224】

照射されたPBMC（自己または同種）は、いくつかの標的抗原、例えばCD19を発現することがあり、本開示のTCRおよび／またはCARにより本開示の細胞またはT細胞を刺激するために使用することができる。あるいは、または加えて、照射された腫瘍細胞はいくつかの標的抗原を発現することがあり、本開示のTCRおよび／またはCARにより本開示の細胞またはT細胞を刺激するために使用することができる。

【0225】

プレートに結合したおよび／または可溶性の抗CD3、抗CD2および／または抗CD28刺激は、本開示のTCRおよび／またはCARにより本開示の細胞またはT細胞を刺激するために使用することができる。

【0226】

抗原でコーティングされたビーズは標的タンパク質を提示することができ、本開示のTCRおよび／またはCARにより本開示の細胞またはT細胞を刺激するために使用することができる。あるいは、または加えて、CAR/CARTyrin標的タンパク質によってコーティングされたエキスパンダービーズは本開示のTCRおよび／またはCARにより本開示の細胞またはT細胞を刺激するために使用することができる。

【0227】

増殖方法は、TCRまたはCAR/CARTyrinにより、および遺伝子修飾T細胞の表面に発現されたCD2、CD3、CD28、4-1BBおよび／または他のマーカーを介して、本開示の細胞またはT細胞の刺激を導く。

【0228】

増殖技術は、ヌクレオフェクション後すぐ、ヌクレオフェクション後およそ24時間までに本開示の細胞に適用することができる。様々な細胞培地を増殖手順中に使用するこ

とができるが、本開示の望ましいT Cell Expansion培地は、例えば、より優れた生存度、細胞表現型、全増殖、in vivoでの存続、生着、および／またはCAR媒介殺滅のより優れた能力を示す細胞を産生することができる。本開示の細胞培地は、本開示の遺伝子修飾細胞の増殖、表現型、および機能を改善／増強するために最適化することができる。増殖したT細胞の好ましい表現型は、T幹細胞メモリー細胞、Tセントラルメモリー細胞、Tエフェクターメモリー細胞の混合物を含んでもよい。Expander Dynabeadsは主に、臨床で優れた性能をもたらしうるセントラルメモリーT細胞を産生することができる。

【0229】

例示的な本開示のT細胞増殖培地は、部分的にまたは全体的に、PBS、HBSS、OptiMEM、DMEM、RPMI 1640、AIM-V、X-VIVO 15、CellGro DC培地、CTS Optimizer T Cell Expansion SFM、TexMACS培地、PRIME-XV T Cell Expansion培地、ImmunoCult-XF T Cell Expansion培地、またはこれらの任意の組み合わせを含みうる。本開示のT細胞増殖培地は、1つまたは複数のさらなる因子をさらに含んでもよい。本開示のT細胞増殖培地に含めることができるさらなる因子は、生存度、細胞表現型、全増殖を増強し、in vivoでの存続、生着、および／またはCAR媒介殺滅の能力を増大する。本開示のT細胞増殖培地に含めることができるさらなる因子は、これらに限定されないが、組換えヒトサイトカイン、ケモカイン、および／またはインターロイキン、例えばIL2、IL7、IL12、IL15、IL21、IL1、IL3、IL4、IL5、IL6、IL8、CXCL8、IL9、IL10、IL11、IL13、IL14、IL16、IL17、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL25、IL26、IL27、IL28、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL35、IL36、GM-CSF、IFN-ガンマ、IL-1アルファ／IL-1F1、IL-1ベータ／IL-1F2、IL-12 p70、IL-12／IL-35 p35、IL-13、IL-17／IL-17A、IL-17A／Fヘテロ二量体、IL-17F、IL-18／IL-1F4、IL-23、IL-24、IL-32、IL-32ベータ、IL-32ガンマ、IL-33、LAP (TGF-ベータ1)、リンホトキシン-アルファ／TNF-ベータ、TGF-ベータ、TNF-アルファ、TRANCE／TNFSF11／RANK L、またはこれらの任意の組み合わせを含む。本開示のT細胞増殖培地に含めることができるさらなる因子は、これらに限定されないが、塩、無機物、および／または代謝物、例えば、HEPES、ニコチンアミド、ヘパリン、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、MEM非必須アミノ酸溶液、アスコルビン酸、ヌクレオシド、FBS／FCS、ヒト血清、代用血清、抗生物質、pH調節剤、アール塩、2-メルカプトエタノール、ヒトトランスフェリン、組換えヒトインスリン、ヒト血清アルブミン、Nucleofector PLUS Supplement、KCL、MgCl2、Na2HPO4、NAH2PO4、ラクトビオン酸ナトリウム、マンニトール、コハク酸ナトリウム、塩化ナトリウム、CINa、グルコース、Ca(NO3)2、Tris/HCl、K2HPO4、KH2PO4、ポリエチレニミン、ポリエチレングリコール、ポロクサマー188、ポロクサマー181、ポロクサマー407、ポリビニルピロリドン、Pop313、クラウン-5、またはこれらの任意の組み合わせを含む。本開示のT細胞増殖培地に含めることができるさらなる因子は、これらに限定されないが、細胞のDNA感知、代謝、分化、シグナル伝達、および／またはアポトーシス経路の阻害剤、例えばTLR9、MyD88、IRAK、TRAF6、TRAF3、IRF-7、NF-KB、1型インターフェロン、炎症促進性サイトカイン、cGAS、STING、Sec5、TBK1、IRF-3、RNA pol III、RIG-1、IPS-1、FADD、RIP1、TRAF3、AIM2、ASC、カスパーゼ1、Pro-IL1B、PI3K、Akt、Wnt3Aの阻害剤、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3β (GSK-3β)の阻害剤 (例えば、TWS119)、パフィロマイシン、クロロキン、キナクリン、AC-YVAD-CMK、Z-VAD-FMK、Z-IETD-F

10

20

30

40

50

M Kまたはこれらの任意の組み合わせを含む。

【0230】

本開示のT細胞増殖培地に含めることができるさらなる因子は、これらに限定されないが、細胞送達を増強し、核送達または輸送を増強し、核酸の核への助長された輸送を増強し、染色体上の核酸の分解を増強し、および／またはDNA媒介毒性を減少させるように核酸を修飾または安定化する試薬、例えば、pH調整剤、DNA結合タンパク質、脂質、リン脂質、CaPO₄、NLS配列を有するもしくは有さない正味中性電荷DNA結合ペプチド、TREX1酵素、またはこれらの任意の組み合わせを含む。

【0231】

本開示の遺伝子修飾細胞は、選択可能な薬物または化合物の使用によって増殖プロセス中に選択することができる。例えば、ある特定の実施形態では、本開示のトランスポゾンが、培養培地に添加される薬物への耐性を遺伝子修飾細胞に付与する選択マーカーをコードすることができる場合、選択は増殖プロセス中に起こることがあり、選択が起こるのにおおよそ1～14日の培養を必要とすることがある。本開示のトランスポゾンによってコードされる選択マーカーとして使用することができる薬物耐性遺伝子の例は、これらに限定されないが、遺伝子neo、DHFR、TYMS、ALDH、MDR1、MGMT、FANCF、RAD51C、GCS、NKX2.2、またはこれらの任意の組み合わせの野生型(WT)または変異体形態を含む。培養培地に添加され、選択マーカーが耐性を付与することができる、対応する薬物または化合物の例は、これらに限定されないが、G418、ピューロマイシン、アンピシリン、カナマイシン、メトトレキサート、メファラン(Mephalan)、テモゾロミド、ビンクリスチン、エトポシド、ドキソルビシン、ベンダムスチン、フルダラビン、アレディア(パミドロン酸二ナトリウム)、ベセナム(Becenum)(カルムスチン)、BiCNU(カルムスチン)、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、カルムブリス(Carmubris)(カルムスチン)、カルムスチン、クラフェン(Clafen)(シクロホスファミド)、シクロホスファミド、シトキサン(シクロホスファミド)、ダラツムマブ、ダルザレックス(ダラツムマブ)、ドキシル(塩酸ドキソルビシンリポソーム)、塩酸ドキソルビシンリポソーム、Dox-SL(塩酸ドキソルビシンリポソーム)、エロツズマブ、エムプリシティ(エロツズマブ)、Evacet(塩酸ドキソルビシンリポソーム)、ファリーダック(パノビノスタット)、イキサゾミブクエン酸エステル、カイプロリス(カルフィルゾミブ)、レナリドマイド、リポドックス(LipoDox)(塩酸ドキソルビシンリポソーム)、モゾビル(プレリキサフォル)、ネオザール(Neosar)(シクロホスファミド)、ニンラーロ(イキサゾミブクエン酸エステル)、パミドロン酸二ナトリウム、パノビノスタット、プレリキサフォル、ポマリドマイド、ポマリスト(ポマリドマイド)、レブリミド(レナリドマイド)、シノビル(Synovir)(サリドマイド)、サリドマイド、サロミド(Thalomid)(サリドマイド)、ベルケイド(ボルテゾミブ)、ゾレドロン酸、ゾメタ(ゾレドロン酸)、またはこれらの任意の組み合わせを含む。

【0232】

本開示のT-Cell Expansionプロセスは、WAVE Bioreactorの細胞培養バッグ、G-Rexフラスコ、または任意の他の好適な容器および／または反応器で生じることができる。

【0233】

本開示の細胞またはT細胞培養物は、安定に維持され、揺すられ、旋回され、または振盪されてもよい。

【0234】

本開示の細胞またはT細胞増殖プロセスは、これらに限定されないが、培養期間、細胞濃度、T細胞培地添加／除去のスケジュール、細胞サイズ、総細胞数、細胞表現型、細胞集団の純度、増殖する細胞集団における遺伝子修飾細胞の百分率、サプリメントの使用および組成、エキスパンダー技術の追加／除去、またはこれらの任意の組み合わせを含む、特定の条件を最適化することができる。

【0235】

本開示の細胞またはT細胞増殖プロセスは、結果生じる増殖した細胞集団の形成前の予め規定された終点まで継続することができる。例えば、本開示の細胞またはT細胞増殖プロセスは、予め決定された時間継続することができる：少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24時間；少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30日；少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週間；少なくとも1、2、3、4、5、6ヵ月、または少なくとも1年。本開示の細胞またはT細胞増殖プロセスは、結果生じる培養物が予め決定された全体細胞密度に達するまで継続することができる：容積（ μl 、 ml 、 L ）当たり1、10、100、1000、104、105、106、107、108、109、1010個の細胞またはその間の任意の密度。本開示の細胞またはT細胞増殖プロセスは、結果生じる培養物の遺伝子修飾細胞が本開示のトランスポゾンが発現の予め決定されたレベルを示すまで継続することができる：1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%またはその間の任意の百分率の発現閾値レベル（発現の最小、最大または平均レベルは、結果生じた遺伝子修飾細胞が臨床的に効果的であることを示している）。本開示の細胞またはT細胞増殖プロセスは、非修飾細胞の割合に対する結果生じる培養物の遺伝子修飾細胞の割合が予め決定された閾値に達するまで継続することができる：少なくとも1：10、1：9、1：8、1：7、1：6、1：5、1：4、1：3、1：2、1：1、2：1、2：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1またはこの間の任意の比。

10

20

【0236】

リリースのための遺伝子修飾自己T細胞の分析

遺伝子修飾細胞の百分率は本開示の増殖プロセスの間または後に評価することができる。本開示の遺伝子修飾細胞によるトランスポゾンの細胞における発現は、蛍光標示細胞ソーティング（FACS）によって測定することができる。例えば、FACSは、本開示のCARを発現している細胞またはT細胞の百分率を決定するために使用することができる。あるいは、または加えて、遺伝子修飾細胞またはT細胞の純度、本開示の遺伝子修飾細胞またはT細胞によって発現されたCARの平均蛍光強度（MFI）、CARリガンドを発現する標的細胞の脱顆粒および／または殺滅を媒介するCARの能力、および／またはCAR+T細胞の表現型を評価することができる。

30

【0237】

被験体への投与を意図する本開示の組成物は、組成物が安全であり、医薬品としての製剤および／または被験体への投与に効果的であることを示す1つまたは複数の「リリース基準」を満たす必要があることがある。リリース基準は、本開示の組成物（例えば、本開示のT細胞産物）が、それらの細胞表面上に検出可能なレベルの本開示のCARを発現するT細胞の特定の百分率を含む要件を含んでもよい。

【0238】

増殖プロセスは、特定の基準が満たされるまで継続するべきである（例えば、特定の総数の細胞を達成すること、メモリー細胞の特別な集団を達成すること、特定のサイズの集団を達成すること）。

40

【0239】

特定の基準は増殖プロセスが終わるべき時点で信号を送る。例えば、細胞は、細胞サイズが300 fLに達すると、製剤化、再活性化、または凍結保存されるべきである（そうでなければ、この閾値を超えたサイズに達する細胞は死に始めることがある）。細胞の集団が300 fLより少ない平均細胞サイズに達してすぐの凍結保存は、細胞が凍結保存前に完全に静止した状態に達していないため解凍および培養時によりよい細胞の回復をもたらすことがある（完全な静止サイズはおおよそ180 fLである）。増殖の前に、本開示のT細胞は約180 fLの細胞サイズを有することがあるが、増殖後3日では、それらの細胞サイズは4倍より大きくなり、おおよそ900 fLになることがある。次の6～12日間にわたり、T細胞の集団はゆっくりと細胞サイズを減少させ、180 fLで完全に静

50

止する。

【0240】

製剤のための細胞集団を調製するプロセスは、これらに限定されないが、細胞集団の細胞を濃縮するステップ、細胞を洗浄するステップ、および／または薬物耐性もしくは特定の表面発現マーカーに対する磁性ビーズのソーティングを介する細胞のさらなる選択のステップを含みうる。製剤のための細胞集団を調製するプロセスは、最終産物の安全性および純度を確実にするソーティングステップをさらに含みうる。例えば、患者由来の腫瘍細胞が、本開示の遺伝子修飾T細胞を刺激するために使用されていた場合、または患者由来の腫瘍細胞が、製剤のために調製されている本開示の遺伝子修飾T細胞を刺激するために遺伝子修飾されていた場合、患者由来の腫瘍細胞が最終産物に含まれないことが重要である。

10

【0241】

細胞産物注入および／または注入のための凍結保存

本開示の医薬製剤は、注入、凍結保存、および／または保管のためにバッグに分配されてもよい。

【0242】

本開示の医薬製剤は、標準的なプロトコール、および任意選択で注入可能な凍結保存培地を使用して凍結保存することができる。例えば、DMSOを含まない凍結保存剤(cryopreservant)(例えば、CryoSOFree(商標)DMSO不含凍結保存培地)が使用して、凍結関連毒性を低減することができる。本開示の凍結保存された医薬製剤は、後日患者への注入のために保管することができる。有効な処置は、本開示の医薬製剤の複数回投与を必要とすることがあり、したがって、医薬製剤は、凍結して保管することができるが個々の用量の解凍のために分けられた予めアリコートにされた「用量」で包装されてもよい。

20

【0243】

本開示の医薬製剤は、室温で保管してもよい。有効な処置は、本開示の医薬製剤の複数回投与を必要とすることがあり、したがって、医薬製剤は、一緒に保管することができるが個々の用量の投与のために分けられた予めアリコートにされた「用量」で包装されてもよい。

【0244】

本開示の医薬製剤は、将来、例えば状態の寛解および再発後、同種異系療法の場合に投与が必要でありうる同じ患者へのさらなる用量の生成のための、その後の再増殖および／または選択のために記録することができる。

30

【0245】

製剤

上述のように、本開示は、薬学的に許容される製剤中に少なくとも1つのタンパク質足場を含む、リン酸緩衝液と食塩水または選択された塩を好ましくは含む安定した製剤、ならびに保存薬を含有する保存溶液および製剤、ならびに薬学的または獣医学的使用に好適な複数回使用用保存製剤を提供する。保存製剤は、少なくとも1つの公知保存薬、または任意選択で、水性希釈剤中の少なくとも1つのフェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、亜硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム(例えば、六水和物)、アルキルパラベン(メチル、エチル、プロピル、ブチルなど)、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサル、ポリマーまたはこれらの混合物からなる群より選択されるものを含有する。約0.0015%、または任意の範囲、値もしくはその中の部分などの、当技術分野において公知であるような任意の好適な濃度または混合物を使用することができる。非限定的な例は、保存薬なし、約0.1~2% m-クレゾール(例えば、0.2、0.3、0.4、0.5、0.9、1.0%)、約0.1~3% ベンジルアルコール(例えば、0.5、0.9、1.1、1.5、1.9、2.0、2.5%)、約0.001~0.5% チメロサル(例えば

40

50

、0.005、0.01)、約0.001~2.0%フェノール(例えば、0.05、0.25、0.28、0.5、0.9、1.0%)、0.0005~1.0%アルキルパラベン(例えば、0.00075、0.0009、0.001、0.002、0.005、0.0075、0.009、0.01、0.02、0.05、0.075、0.09、0.1、0.2、0.3、0.5、0.75、0.9、1.0%)などを含む。

【0246】

上述のように、本発明は、包装材料と、任意選択で水性希釈剤中の、処方された緩衝剤および／または保存薬を有する少なくとも1つのタンパク質足場の溶液を含む少なくとも1つのバイアルとを含む製造品であって、前記包装材料が、そのような溶液を1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72時間またはそれより長時間の期間にわたって保持することができることを示すラベルを含む、製造品を提供する。本発明は、包装材料と、凍結乾燥された少なくとも1つのタンパク質足場を含む第1のバイアルと、処方された緩衝剤または保存薬の水性希釈剤を含む第2のバイアルとを含む製造品であって、前記包装材料が、水性希釈剤中の少なくとも1つのタンパク質足場を再構成して、24時間またはそれより長時間の期間にわたって保持することができる溶液を形成するように患者に指示するラベルを含む、製造品をさらに含む。

10

【0247】

本発明に従って使用される少なくとも1つのタンパク質足場は、哺乳動物細胞またはトランスジェニック調製物からのものを含む、組換え手段により産生させることができ、または本明細書に記載されるような、もしくは当技術分野において公知であるような他の生物学的供給源から精製することができる。

20

【0248】

本発明の製品中の少なくとも1つのタンパク質足場の範囲は、再構成時に得られる量、湿潤／乾燥系での場合、約 $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ ~約 $1000\text{mg}/\text{ml}$ の濃度を含むがより低濃度およびより高濃度が使用可能であり、所期の送達ビヒクルに依存し、例えば、溶液製剤は、経皮パッチ、経肺、経粘膜、または浸透圧もしくはマイクロポンプ法とは異なる。

【0249】

好ましくは、水性希釈剤は、任意選択で、薬学的に許容される保存薬をさらに含む。好ましい保存薬は、フェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン(メチル、エチル、プロピル、ブチルなど)、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサル、またはこれらの混合物からなる群より選択されるものを含む。製剤に使用される保存薬の濃度は、抗菌効果を生じさせるのに十分な濃度である。そのような濃度は、選択される保存薬に依存し、当業者によって容易に決定される。

30

【0250】

他の賦形剤、例えば、等張剤(isotonicity agent)、緩衝剤、抗酸化剤、および保存向上剤(preservative enhancer)を希釈剤に、任意選択で、および好ましくは、添加することができる。グリセリンなどの等張剤は、公知の濃度で一般に使用される。生理学的に忍容される緩衝剤が、改善されたpH制御を提供するために添加されるのが好ましい。製剤は、約pH4~約pH10、および約pH5~約pH9の好ましい範囲、および約6.0~約8.0の最も好ましい範囲などの、広範なpHに及ぶ。好ましくは、本発明の製剤は、約6.8~約7.8の間のpHを有する。好ましい緩衝剤は、リン酸緩衝液、最も好ましくは、リン酸ナトリウム、特に、リン酸緩衝食塩水(PBS)を含む。

40

【0251】

他の添加剤、例えば、Tween 20(モノラウリン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン)、Tween 40(モノパルミチン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン)、Tween 80(モノオレイン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン)、

50

Pluronic F68（ポリオキシエチレン・ポリプロピレンブロックコポリマー）およびPEG（ポリエチレングリコール）のような、薬学的に許容される可溶化剤；またはポリソルベート20もしくは80またはポロキサマー184もしくは188、Pluronic（登録商標）ポリオール（polyol）、他のブロックコポリマーなどの、非イオン性界面活性剤；ならびにEDTAおよびEGTAなどのキレート剤を、任意選択で、凝集を低減させるために製剤または組成物に添加することができる。これらの添加剤は、製剤を投与するためにポンプまたはプラスチック容器が使用される場合、特に有用である。薬学的に許容される界面活性剤の存在は、タンパク質が凝集する傾向を弱める。

【0252】

本発明の製剤は、水性希釈剤中において、少なくとも1つのタンパク質足場と、フェノール、*m*-クレゾール、*p*-クレゾール、*o*-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサルまたはこれらの混合物からなる群より選択される保存薬とを混合するステップを含む方法により調製することができる。水性希釈剤中において、少なくとも1つのタンパク質足場と、保存薬とを混合するステップは、従来の溶解および混合手順を使用して行われる。好適な製剤を調製するために、例えば、緩衝溶液中の測定された量の少なくとも1つのタンパク質足場を、緩衝溶液中の所望の保存薬と、所望の濃度のタンパク質および保存薬を提供するのに十分な量で併せる。この方法のバリエーションは、当業者には認識される。例えば、成分が添加される順序、さらなる添加剤が使用されるかどうか、製剤が調製される温度およびpHは、すべて、使用される濃度および投与手段に合わせて最適化することができる因子である。

【0253】

特許請求される製剤を、患者に、透明溶液として提供することができ、あるいは再構成される凍結乾燥された少なくとも1つのタンパク質足場のバイアルと、水、水性希釈剤中の保存薬および／または賦形剤、好ましくは、リン酸緩衝液および／もしくは食塩水および選択された塩を収容している第2のバイアルを含む、デュアルバイアルとして、提供することができる。単一の溶液バイアルかまたは再構成を必要とするデュアルバイアルを、複数回再使用することができ、そのようなバイアルは、患者の単一または複数の処置サイクルに十分なものでありうるため、現在利用可能な処置レジメンより便利な処置レジメンを提供することができる。

【0254】

特許請求される本製造品は、即時から24時間またはそれより長時間に及ぶ期間にわたる投与に有用である。したがって、今般特許請求される製造品は、患者に有意な利点をもたらす。本発明の製剤は、任意選択で、約2℃～約40℃の温度で安全に保管することができ、かつタンパク質の生物活性を長期間保持することができるため、溶液を6、12、18、24、36、48、72もしくは96時間またはそれより長時間の期間にわたって保持および／または使用することができることを示すパッケージラベルが許容される。保存希釈剤が使用される場合、そのようなラベルは、1～12カ月、半年、1年半および／または2年までの使用を含むことができる。

【0255】

本発明の少なくとも1つのタンパク質足場の溶液は、水性希釈剤の中の少なくとも1つのタンパク質足場を混合するステップを含む方法により調製することができる。混合するステップは、従来の溶解および混合手順を使用して行われる。好適な希釈剤を調製するために、例えば、水または緩衝液中の測定された量の少なくとも1つのタンパク質足場を、所望の濃度のタンパク質および任意選択で保存薬または緩衝剤を提供するのに十分な量で併せる。この方法のバリエーションは、当業者には認識される。例えば、成分が添加される順序、さらなる添加剤が使用されるかどうか、製剤が調製される温度およびpHは、すべて、使用される濃度および投与手段に合わせて最適化することができる因子である。

【0256】

特許請求される製品を、患者に、透明溶液として提供することができ、または再構成される凍結乾燥された少なくとも1つのタンパク質足場のバイアルと、水性希釈剤を収容している第2のバイアルを含む、デュアルバイアルとして、提供することができる。単一の溶液バイアルかまたは再構成を必要とするデュアルバイアルを、複数回再使用することができ、そのようなバイアルは、患者の単一または複数の処置サイクルに十分なものでありうるため、現在利用可能な処置レジメンより便利な処置レジメンを提供する。

【0257】

薬局、診療所または他のそのような機関および施設に、透明溶液を提供することにより、または再構成される凍結乾燥された少なくとも1つのタンパク質足場のバイアルと、水性希釈剤を収容している第2のバイアルを含む、デュアルバイアルを提供することにより、特許請求される製品を患者に間接的に提供することができる。この場合の透明溶液は、最大1リットルまたはさらにはそれより大きいサイズであってもよく、したがって、大型のリザーバを提供することができ、このリザーバから、少なくとも1つのタンパク質足場溶液のより少ない分量を、より小さいバイアルに移すために1回または複数回取り出すことができ、薬局または診療所によって顧客および／または患者に提供することができる。

【0258】

単一バイアルシステムを含む認知されているデバイスは、溶液を送達するためのペン型注射器デバイス、例えば、例えばBecton Dickinson (Franklin Lakes, N. J., www.bectondickinson.com)、Disetronic (Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com)、Bioject, Portland, Oreg. (www.bioject.com)、National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com)、Medi-Ject Corp (Minneapolis, Minn., www.mediject.com)により作製または開発されたような、BD Pen、BD Autojector (登録商標)、Humaject (登録商標)、NovoPen (登録商標)、B-D (登録商標) Pen、AutoPen (登録商標)、およびOptiPen (登録商標)、Genotropin Pen (登録商標)、Genotronorm Pen (登録商標)、Humatro Pen (登録商標)、Recor-Pen (登録商標)、Roferon Pen (登録商標)、Biojector (登録商標)、Iject (登録商標)、J-tip Needle-Free Injector (登録商標)、Intraject (登録商標)、Medi-Ject (登録商標)、および同様に好適なデバイスを含む。デュアルバイアルシステムを含む認知されているデバイスは、再構成された溶液の送達のためのカートリッジ内で凍結乾燥薬物を再構成するペン型注射器システム、例えば、Humatro Pen (登録商標)を含む。好適な他のデバイスの例は、充填済みシリンジ、自動注射器、無針注射器、および無針IV注入セットを含む。

【0259】

今般特許請求される製品は、包装材料を含む。包装材料は、監督機関により求められる情報に加えて、製品を使用することができる条件を提供する。本発明の包装材料は、少なくとも1つのタンパク質足場を水性希釈剤で再構成して溶液を形成するための指示、およびその溶液を2バイアル、湿潤／乾燥、製品については2～24時間またはそれより長時間の期間にわたって使用するための指示を患者に提供する。単一バイアルの溶液製品については、ラベルは、そのような溶液を2～24時間またはそれより長時間の期間にわたって使用することができることを示す。今般特許請求される製品は、ヒトでの薬学的製品の使用に有用である。

【0260】

本発明の製剤は、少なくとも1つのタンパク質足場と選択された緩衝剤、好ましくは、食塩水または選択された塩を含有するリン酸緩衝液とを混合するステップを含む方法により、調製することができる。水性希釈剤中において少なくとも1つのタンパク質足場と緩

衝剤とを混合するステップは、従来の溶解および混合手順を使用して行われる。好適な製剤を調製するために、例えば、水または緩衝液中の測定された量の少なくとも1つのタンパク質足場を、水中の所望の緩衝化剤と、所望の濃度のタンパク質および緩衝剤を提供するのに十分な量で併せる。この方法のバリエーションは、当業者には認識される。例えば、成分が添加される順序、さらなる添加剤が使用されるかどうか、製剤が調製される温度およびpHは、すべて、使用される濃度および投与手段に合わせて最適化することができる因子である。

【0261】

特許請求される安定または保存製剤を、患者に、透明溶液として提供することができ、または再構成される凍結乾燥されたタンパク質足場のバイアルと、水性希釈剤中の保存薬もしくは緩衝剤および賦形剤を収容している第2のバイアルを含む、デュアルバイアルとして、提供することができる。単一溶液バイアルかまたは再構成を必要とするデュアルバイアルを、複数回再使用することができ、そのようなバイアルは、患者の単一または複数の処置サイクルに十分なものでありうるため、現在利用可能な処置レジメンより便利な処置レジメンを提供する。

【0262】

タンパク質足場を安定化する他の製剤または方法は、タンパク質足場を含む凍結乾燥粉末の透明溶液以外のものをもたらしことがある。非透明溶液には、微粒子懸濁物を含む製剤もあり、前記微粒子は、可変寸法の構造であって、マイクロスフェア、マイクロ粒子、ナノ粒子、ナノスフェアまたはリポソームとして様々に公知である構造のタンパク質足場を含有する組成物である。活性薬剤を含有する、そのような比較的均一な、本質的に球形の、微粒子製剤は、米国特許第4,589,330号で教示されているように、活性薬剤およびポリマーを含有する水性相と非水性相を接触させ、その後、非水性相を蒸発させて、水性相からの粒子を合体させることによって形成することができる。多孔質マイクロ粒子は、米国特許第4,818,542号で教示されているように、連続溶媒に分散された活性薬剤およびポリマーを含有する第1の相を使用し、フリーズドライまたは希釈-抽出-沈殿により懸濁物から前記溶媒を除去して、調製することができる。そのような調製に好ましいポリマーは、ゼラチン、寒天、デンプン、アラビノガラクトサン、アルブミン、コラーゲン、ポリグリコール酸、ポリ乳酸 (poly lactic acid)、グリコリド-L(-)ラクチドポリ (イプシロン (epsilon)-カプロラクトン)、ポリ (イプシロン-カプロラクトン-CO-乳酸)、ポリ (イプシロン-カプロラクトン-CO-グリコール酸)、ポリ (β-ヒドロキシ酪酸)、ポリエチレンオキシド、ポリエチレン、ポリ (アルキル-2-シアノアクリレート)、ポリ (ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリアミド、ポリ (アミノ酸)、ポリ (2-ヒドロキシエチルDL-アスパルタミド)、ポリ (エステル尿素)、ポリ (L-フェニルアラニン/エチレングリコール/1,6-ジイソシアナトヘキサン) およびポリ (メチルメタクリレート) からなる群より選択される、天然または合成コポリマーまたはポリマーである。特に好ましいポリマーは、ポリエステル、例えば、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコリド-L(-)ラクチドポリ (イプシロン-カプロラクトン)、ポリ (イプシロン-カプロラクトン-CO-乳酸)、およびポリ (イプシロン-カプロラクトン-CO-グリコール酸) である。ポリマーおよび/または活性薬剤を溶解するのに有用な溶媒は、水、ヘキサフルオロイソプロパノール、塩化メチレン、テトラヒドロフラン、ヘキサン、ベンゼン、またはヘキサフルオロアセトン・セスキ水和物を含む。活性薬剤含有相を第2の相とともに分散させる方法は、前記第1の相に圧力をかけて強制的にノズルの開口部を通して、液滴の形成を果すことを含む。

【0263】

乾燥粉末製剤は、凍結乾燥以外の方法、例えば、噴霧乾燥、または蒸発による溶媒抽出による方法、または結晶質組成物の沈殿、それに続いての水性もしくは非水性溶媒を除去する1もしくは複数のステップによる方法の結果として得ることができる。噴霧乾燥タンパク質足場調製物の調製は、米国特許第6,019,968号で教示されている。タンパ

ク質足場に基づく乾燥粉末組成物は、溶媒中のタンパク質足場および任意選択で賦形剤の溶液またはスラリーを、吸入可能な乾燥粉末をもたらす条件下で噴霧乾燥させることによって生成することができる。溶媒は、容易に乾燥させることができる極性化合物、例えば、水およびエタノールを含むことができる。タンパク質足場の安定性は、酸素の非存在下で、例えば、窒素ブランケットのもとで、または乾燥ガスとして窒素を使用することにより、噴霧乾燥手順を行うことによって、増強することができる。別の比較的乾燥した製剤は、WO 99 164 19で教示されているように、ヒドロフルオロアルカン噴霧体を通常は含む懸濁媒体に分散された複数の有孔微細構造の分散物である。安定化した分散物を、定量吸入器を使用して患者の肺に投与することができる。噴霧乾燥された医薬の商業的製造に有用な装置は、B u c h i L t d. またはN i r o C o r p. により製造されている。

10

【0264】

本明細書に記載の安定または保存製剤または溶液のいずれかにおける少なくとも1つのタンパク質足場は、本発明に従って、様々な送達方法によって、患者に投与することができる。そのような方法は、当技術分野において周知であるような、SCもしくはIM注射、経皮、経肺、経粘膜、インプラント、浸透圧ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプ、または当業者に認められている他の手段を含む。

【0265】

治療適用

本発明は、当技術分野において公知であるような、または本明細書に記載されるような、細胞、組織、器官、動物または患者における疾患をモジュレートまたは処置する方法であって、本発明の少なくとも1つのタンパク質足場を使用して、例えば、細胞、組織、器官、動物もしくは患者に治療有効量のタンパク質足場を投与して、または細胞、組織、器官、動物もしくは患者を治療有効量のタンパク質足場と接触させて、モジュレートまたは処置する方法も提供する。本発明は、細胞、組織、器官、動物または患者における、これに限定されないが悪性疾患を含む、疾患をモジュレートまたは処置する方法も提供する。

20

【0266】

本発明は、細胞、組織、器官、動物または患者における、これらに限定されないが、白血病、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性リンパ球性白血病、B細胞、T細胞またはFAB ALL、急性骨髄系白血病（acute myeloid leukemia）（AML）、急性骨髄性白血病（acute myelogenous leukemia）、慢性骨髄球性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、ヘアリー細胞白血病、骨髄異形成症候群（MDS）、リンパ腫、ホジキン病、悪性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、カボジ肉腫、結腸直腸癌、膵臓癌、鼻咽頭癌、悪性組織球増殖症、腫瘍随伴症候群／悪性疾患に伴う高カルシウム血症、固形腫瘍、膀胱がん、乳がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、頭部がん、頸部がん、遺伝性非ポリポーシスがん、ホジキンリンパ腫、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、腎細胞癌、精巣がん、腺癌、肉腫、悪性黒色腫、血管腫、転移性疾患、がん関連骨吸収、がん関連骨痛などのうちの少なくとも1つを含む、少なくとも1つの悪性疾患をモジュレートまたは処置する方法も提供する。

30

40

【0267】

本発明のいずれの方法も、少なくとも1つのタンパク質足場を含む組成物または医薬組成物の有効量を、そのようなモジュレーション、処置または治療を必要とする細胞、組織、器官、動物または患者に投与するステップを含むことができる。そのような方法は、そのような疾患または障害を処置するための共投与（co-administration）または併用療法であって、前記少なくとも1つのタンパク質足場、その指定部分または改変体の投与が、アルキル化剤、有糸分裂阻害剤および放射性薬品のうちの少なくとも1つから選択される少なくとも1つの前に、それと同時に、および／またはその後投与するステップをさらに含む、共投与または併用療法を任意選択でさらに含むことができる。好適な投薬量は、当技術分野において周知である。例えば、Wellsら編、Pharm

50

acotherapy Handbook、第2版、Appleton and Lange、Stamford、Conn. (2000年) ; PDR Pharmacopoeia、Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000、豪華版、Tarascon Publishing、Loma Linda、Calif. (2000年) ; Nursing 2001 Handbook of Drugs、第21版、Springhouse Corp.、Springhouse、Pa.、2001年 ; Health Professional's Drug Guide 2001、Shannon、Wilson、Stang編、Prentice-Hall, Inc、Upper Saddle River、N. J. を参照されたく、これらの参考文献の各々は、全体が参照により本明細書に援用される。

10

【0268】

好ましい用量は、約0.1～99および／もしくは100～500mg/kg投与、またはその任意の範囲、値もしくは部分、あるいは単回もしくは複数回の投与により血清中濃度約0.1～5000μg/mlという血清中濃度を達成するための用量、またはその任意の範囲、値もしくは部分を任意選択で含むことができる。本発明のタンパク質足場の好ましい投薬量範囲は、患者の体重1kg当たり約1mgから約3、約6または約12mgまでである。

【0269】

あるいは、投与される投薬量は、特定の薬剤の薬力学的特性、ならびにその投与方式および経路；レシピエントの年齢、健康状態および体重；症状の性質および程度、同時の処置の種類、処置の頻度、ならびに所望される効果などの、公知の因子に依存して変わりうる。通例、活性成分の投薬量は、体重1キログラム当たり約0.1～100ミリグラムでありうる。1投与当たりまたは徐放形態で、1キログラムにつき通常は0.1～50および好ましくは0.1～10ミリグラムが、所望の結果を得るのに有効である。

20

【0270】

非限定的な例として、単回用量、注入用量または反復用量を使用して、1～40日目の少なくとも1時点、または代替的にもしくは加えて1～52週目の少なくとも1時点、または代替的にもしくは加えて1～20年の少なくとも1時点、またはこれらの任意の組み合わせの時点において、1日当たり約0.1～100mg/kgまたはその任意の範囲、値もしくは部分の、本発明の少なくとも1つのタンパク質足場の1回のまたは定期的な投薬量として、ヒトまたは動物の処置を提供することができる。

30

【0271】

内部投与に好適な剤形（組成物）は、一般に、1単位または1容器当たり約0.001ミリグラム～約500ミリグラムの活性成分を含有する。これらの医薬組成物中の活性成分は、通常、組成物の全重量に基づいて約0.5～99.999重量%の量で存在することになる。

【0272】

非経口投与のために、タンパク質足場を、薬学的に許容される非経口用ビヒクルと会合している、またはそれと別々に提供される、溶液、懸濁物、エマルジョン、粒子、粉末または凍結乾燥粉末として、製剤化することができる。そのようなビヒクルの例は、水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および約1～10%ヒト血清アルブミンである。リポソームおよび非水性ビヒクル、例えば固定油も、使用することができる。ビヒクルまたは凍結乾燥粉末は、等張性を維持するための添加剤（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性を維持するための添加剤（例えば、緩衝剤および保存薬）を含有することができる。製剤は、公知のまたは好適な技術により滅菌される。

40

【0273】

好適な医薬担体は、当分野の標準参照テキストであるRemington's Pharmaceutical Sciences、A. Osolの最新版に記載されている。

【0274】

50

代替的な投与

本発明による少なくとも1つのタンパク質足場の薬学的有効量を投与するために、多くの公知のおよび開発された方式を、本発明に従って使用することができる。経肺投与が下記の説明の中で使用されるが、他の投与方式を本発明に従って好適な結果で使用することができる。ここで説明されるまたは当技術分野において公知の吸入または他の方式による投与に好適な様々なデバイスおよび方法のいずれかを使用して、担体の中の、溶液、エマルジョン、コロイドもしくは懸濁物としての、または乾燥粉末としての、本発明のタンパク質足場を送達することができる。

【0275】

非経口製剤および投与

非経口投与用の製剤は、一般的な賦形剤として、滅菌水または食塩水、ポリアルキレングリコール、例えばポリエチレングリコール、植物由来の油、水素化ナフタレンなどを含有することができる。注射用の水性または油性懸濁物は、公知の方法に従って、適切な乳化剤または湿潤剤 (humidifier) および懸濁化剤を使用することにより、調製することができる。注射用の薬剤は、水溶液、溶媒中の滅菌注射用溶液または懸濁物などの、非毒性で非経口投与可能な希釈剤でありうる。使用可能なビヒクルまたは溶媒として、水、リンゲル液、等張食塩水などが許容される。通常溶媒または懸濁溶媒として、滅菌不揮発性油を使用することができる。これらのために、天然または合成または半合成脂肪油または脂肪酸、天然または合成または半合成モノまたはジまたはトリグリセリドを含む、任意の種類の不揮発性油および脂肪酸を使用することができる。非経口投与は当技術分野において公知であり、非経口投与は、これらに限定されないが、従来の注射手段、米国特許第5,851,198号に記載されているようなガス加圧式無針注射デバイス、および米国特許第5,839,446号に記載されているようなレーザー穿孔デバイス (laser perforator device) を含み、特許文献は、全体が参照により本明細書に援用される。

【0276】

代替的な送達

本発明は、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内 (intrarticular)、気管支内、腹部内、嚢内、軟骨内、腔内 (intracavitary)、腔内 (intracellial)、小脳内、脳室内、結腸内、頸部内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、脊髄内、滑液包内、胸腔内、子宮内、膀胱内、病巣内、ボーラス、経膈、直腸、頬側、舌下、鼻腔内または経皮手段による、少なくとも1つのタンパク質足場の投与に、さらに関する。少なくとも1つのタンパク質足場組成物は、非経口 (皮下、筋肉内もしくは静脈内) または任意の他の投与に使用するために、特に、溶液または懸濁物の形態で調製することができ；経膈または直腸投与の際に使用するために、特に、これらに限定されないがクリームおよび坐剤などの、半固体形態で調製することができ；頬側または舌下投与のために、例えば、これらに限定されないが、錠剤またはカプセルの形態で調製することができ；または鼻腔内使用のために、例えば、これらに限定されないが、粉末、点鼻薬 (nasal drop) またはエアロゾルまたはある特定薬剤の形態で調製することができ；または経皮使用のために、例えば、これらに限定されないが、皮膚構造を修飾するためのもしくは経皮パッチ中の薬物濃度を増加させるためのジメチルスルホキシドなどの化学的促進剤 (全体が参照により本明細書に援用される、Jungingerら、「Drug Permeation Enhancement」、Hsieh, D. S. 編、59~90頁 (Marcel Dekker, Inc., New York 1994年)) を伴う、あるいはタンパク質およびペプチドを含有する製剤の皮膚への塗布 (WO98/53847) を可能にする、またはエレクトロポレーションなどの、一過性輸送経路を生じさせるための、もしくはイオントフォレーシスなどの、皮膚を通しての荷電薬物の移動を増加させるための電場の印加、またはソノフォレーシスなどの、超音波の適用 (米国特許第4,309,989号および同第4,767,402号) を可能にする、酸化剤を伴う、ゲル、軟

膏、ローション、懸濁物またはパッチ送達システムの形態で調製することができる（上記刊行物および特許は、全体が参照により本明細書に援用される）。

【0277】

経肺／経鼻投与

経肺投与のために、好ましくは、少なくとも1つのタンパク質足場組成物は、肺の下気道または洞への到達に有効な粒径で送達される。本発明によれば、少なくとも1つのタンパク質足場を、吸入による治療剤の投与のための当技術分野において公知の様々な吸入または鼻用デバイスのいずれによっても送達することができる。患者の洞または肺胞内にエアロゾル化した製剤を堆積させることができるこれらのデバイスは、定量吸入器、ネブライザー、乾燥粉末発生器、噴霧器などを含む。タンパク質足場の経肺または経鼻投与を導くのに好適な他のデバイスも、当技術分野において公知である。すべてのそのようなデバイスは、エアロゾルでタンパク質足場を調剤するための投与に好適な製剤を使用することができる。そのようなエアロゾルは、溶液（水性および非水性両方）からなってもよく、または固体粒子からなってもよく。

【0278】

Ventolin 定量吸入器のような定量吸入器は、通常は噴霧体ガスを使用し、吸息中に作動する必要がある（例えば、WO 94/16970、WO 98/35888を参照されたい）。Turbuhaler（商標）（Astra）、Rotahaler（登録商標）（Glaxo）、Diskus（登録商標）（Glaxo）、Spiros（商標）吸入器（Dura）、Inhale Therapeuticsにより販売されているデバイス、およびSpinhaler（登録商標）粉末吸入器（Fisons）のような、乾燥粉末吸入器は、混合粉末の呼吸作動を使用する（全体が参照により本明細書に援用される、米国特許第4,668,218号 Astra、欧州特許第237507号 Astra、WO 97/25086 Glaxo、WO 94/08552 Dura、米国特許第5,458,135号 Inhale、WO 94/06498 Fisons）。AERx（商標）Aradigm、Ultravent（登録商標）ネブライザー（Mallinckrodt）、およびAcorn II（登録商標）ネブライザー（Marquest Medical Products）（米国特許第5,404,871号 Aradigm、WO 97/22376）のようなネブライザー（上記参照文献は、全体が参照により本明細書に援用される）は、溶液からエアロゾルを生じさせるが、定量吸入器、乾燥粉末吸入器などは、小粒子エアロゾルを発生させる。市販の吸入デバイスのこれらの具体的な例は、本発明の実施に好適な具体的なデバイスの代表であることを意図したものであり、本発明の範囲を限定するものとして意図したものではない。

【0279】

好ましくは、少なくとも1つのタンパク質足場を含む組成物は、乾燥粉末吸入器または噴霧器により送達される。本発明の少なくとも1つのタンパク質足場を投与するための吸入デバイスについてのいくつかの望ましい特徴がある。例えば、吸入デバイスによる送達は、有利なことに、信頼性があり、再現性があり、正確である。吸入デバイスは、良好に呼吸できるように、任意選択で、小さい乾燥粒子、例えば、約10 μm 未満、好ましくは約1～5 μm の乾燥粒子を送達することができる。

【0280】

噴霧剤（spray）としてのタンパク質足場組成物の投与

タンパク質足場組成物を含む噴霧剤は、圧力下で、少なくとも1つのタンパク質足場の懸濁物または溶液を強制的にノズルに通すことにより生じさせることができる。所望のアウトプットおよび粒径を獲得するために、ノズルのサイズおよび構成、印加圧力ならびに液体供給速度を選択することができる。例えば、毛管またはノズルフィードと接続している電場により、エレクトロスプレーを生じさせることができる。有利なことに、噴霧器により送達される少なくとも1つのタンパク質足場組成物の粒子は、約10 μm 未満の粒径、好ましくは約1 μm ～約5 μm および最も好ましくは約2 μm ～約3 μm の範囲の粒径を有する。

【0281】

噴霧器での使用に好適な少なくとも1つのタンパク質足場組成物の製剤は、通常、水溶液中のタンパク質足場組成物を、溶液1ml当たり少なくとも1つのタンパク質足場組成物約0.1mg～約100mg、もしくはmg/gm、またはその中の任意の範囲、値もしくはは部分の濃度で含む。製剤は、賦形剤、緩衝剤、等張剤、保存薬、界面活性剤および好ましくは亜鉛などの、薬剤を含むことができる。製剤は、緩衝剤、還元剤、バルクタンパク質または炭水化物などの、タンパク質足場組成物の安定化のための賦形剤または薬剤も含むことができる。タンパク質足場組成物の製剤化に有用なバルクタンパク質は、アルブミン、プロタミンなどを含む。タンパク質足場組成物の製剤化に有用な典型的な炭水化物は、スクロース、マンニトール、ラクトース、トレハロース、グルコースなどを含む。タンパク質足場組成物製剤は、エアロゾルの形成中の溶液の霧化により引き起こされるタンパク質足場組成物の表面誘起凝集を低減または防止することができる、界面活性剤も含むことができる。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコール、ならびにポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルなどの、様々な従来の界面活性剤を、用いることができる。量は、一般に、製剤の0.001～14重量%の間の範囲である。本発明のために特に好ましい界面活性剤は、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ポリソルベート80、ポリソルベート20などである。タンパク質足場などのタンパク質、または指定部分もしくは改変体の製剤のための当技術分野において公知のさらなる薬剤も、製剤に含めることができる。

10

【0282】

ネブライザーによるタンパク質足場組成物の投与

本発明のタンパク質足場組成物を、ジェットネブライザーまたは超音波ネブライザーなどの、ネブライザーにより投与することができる。通常は、ジェットネブライザーの場合、圧縮空気源を使用して、開口部を通して高速空気ジェットを生じさせる。ガスがノズルを越えて膨張すると、低圧領域が作られ、それにより、液体レザバに接続された毛管を通してタンパク質足場組成物の溶液が引っ張られる。毛管からの液体流は、毛管から出ると剪断されて不安定なフィラメントおよび液滴になり、その結果、エアロゾルが生じる。所与のジェットネブライザーから所望の性能特性を獲得するために、様々な構成、流速、およびバッフルのタイプを用いることができる。超音波ネブライザーの場合、高周波電気エネルギーを使用して、通常は圧電変換器を用いて、振動、機械エネルギーを生じさせる。このエネルギーが、タンパク質足場組成物の製剤に、直接、またはカップリング流体を介して伝達され、その結果、タンパク質足場組成物を含むエアロゾルが生じる。有利には、ネブライザーにより送達されるタンパク質足場組成物の粒子は、約10μm未満の粒径、好ましくは約1μm～約5μmおよび最も好ましくは約2μm～約3μmの範囲の粒径を有する。

20

30

【0283】

ジェットまたは超音波のいずれかのネブライザーでの使用に好適な少なくとも1つのタンパク質足場の製剤は、通常は、溶液1ml当たり約0.1mg～約100mgの濃度の少なくとも1つのタンパク質足場を含む。製剤は、賦形剤、緩衝剤、等張剤、保存薬、界面活性剤および好ましくは亜鉛などの、薬剤を含むことができる。製剤は、緩衝剤、還元剤、バルクタンパク質または炭水化物などの、少なくとも1つのタンパク質足場組成物の安定化のための賦形剤または薬剤も含むことができる。少なくとも1つのタンパク質足場組成物の製剤化に有用なバルクタンパク質は、アルブミン、プロタミンなどを含む。少なくとも1つのタンパク質足場の製剤化に有用な典型的な炭水化物は、スクロース、マンニトール、ラクトース、トレハロース、グルコースなどを含む。少なくとも1つのタンパク質足場製剤は、エアロゾルの形成中の溶液の霧化により引き起こされる少なくとも1つのタンパク質足場の表面誘起凝集を低減または防止することができる、界面活性剤も含むことができる。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコール、ならびにポリオキシエチレンソルビタール脂肪酸エステルなどの、様々な従来の界面活性剤を、用いることができる。量は、一般に、製剤の約0.001～4重量%の間の範囲である。本発明のため

40

50

に特に好ましい界面活性剤は、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ポリソルベート 80、ポリソルベート 20 などである。タンパク質足場などのタンパク質の製剤のための当技術分野において公知のさらなる薬剤も、製剤に含めることができる。

【0284】

定量吸入器によるタンパク質足場組成物の投与

定量吸入器 (MDI) では、噴霧体、少なくとも 1 つのタンパク質足場、および任意の賦形剤または他の添加剤が、液化圧縮ガスを含む混合物として、キャニスターの中に収容されている。計量弁 (metering valve) の作動により、混合物が、約 10 μm 未満、好ましくは約 1 μm ~ 約 5 μm 、および最も好ましくは約 2 μm ~ 約 3 μm のサイズ範囲の粒子を好ましくは含有するエアロゾルとして、放出される。ジェットミリング、噴霧乾燥、臨界点凝結などを含む、当業者に公知の様々な方法により產生されたタンパク質足場組成物の製剤を用いることによって、所望のエアロゾル粒径を得ることができる。好ましい定量吸入器は、3M または Glaxo により製造されたおよびヒドロフルオロカーボン噴霧体を用いるものを含む。定量吸入器デバイスで使用するための少なくとも 1 つのタンパク質足場の製剤は、非水性媒体中の懸濁物、例えば、界面活性剤の補助の下、噴霧体に懸濁された懸濁物として少なくとも 1 つのタンパク質足場を含有する微細に分割された粉末を、通常は含む。噴霧体は、この目的で用いられる任意の従来の材料、例えば、クロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、または炭化水素 (トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノールおよび 1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタンを含む)、HFA-134a (ヒドロフルオロアルカン-134a)、HFA-227 (ヒドロフルオロアルカン-227) などでありうる。好ましくは、噴霧体は、ヒドロフルオロカーボンである。例えば、噴霧体中の懸濁物として少なくとも 1 つのタンパク質足場を安定化するために、または活性薬剤を化学的分解から保護するなどのために、界面活性剤を選択することができる。好適な界面活性剤は、トリオレイン酸ソルビタン、大豆レシチン、オレイン酸などを含む。一部の事例では、エタノールなどの溶媒を使用する溶液エアロゾルが好ましい。タンパク質の製剤のための当技術分野において公知のさらなる薬剤も、製剤に含めることができる。本明細書に記載されないデバイスによる少なくとも 1 つのタンパク質足場組成物の経肺投与により本発明の方法を達成することができることは、当業者には認識される。

【0285】

経口製剤および投与

経口投与用の製剤は、腸壁の透過性を人工的に上昇させるためのアジュバント (例えば、レゾルシノールならびに非イオン性界面活性剤、例えばポリオキシエチレンオレイルエーテルおよび n-ヘキサデシルポリエチレンエーテル) の共投与、ならびに酵素的分解を阻害するための酵素阻害剤 (例えば、膵臓トリプシンインヒビター、ジイソプロピルフルオロリン酸 (DFF) およびトラジロール) の共投与に依拠する。経口、頬側、粘膜、経鼻、経肺、経膈、膜貫通または直腸投与が意図された、タンパク質とタンパク質足場と少なくとも 2 つの界面活性剤の組み合わせとを含む親水性薬剤の送達のための製剤は、米国特許第 6, 309, 663 号で教示されている。経口投与のための固体型の剤形の活性成分化合物を、スクロース、ラクトース、セルロース、マンニトール、トレハロース、ラフィノース、マルチトール、デキストラン、デンプン、寒天、アルギネート、キチン、キトサン、ペクチン、トラガカントゴム、アラビアゴム、ゼラチン、コラーゲン、カゼイン、アルブミン、合成または半合成ポリマー、およびグリセリドを含む、少なくとも 1 つの添加剤と混合することができる。これらの剤形は、他のタイプの添加剤、例えば、不活性希釈剤、滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、パラベン、保存剤、例えばソルビン酸、アスコルビン酸、アルファートコフェロール、抗酸化剤、例えばシステイン、崩壊剤、結合剤、増粘剤、緩衝化剤、甘味剤、矯味矯臭剤、芳香剤なども含有することができる。

【0286】

錠剤および丸剤を腸溶性コーティング調製物にさらに加工することができる。経口投与

用の液体調製物は、医学的使用に許容されうるエマルジョン、シロップ、エリキシル、懸濁物および溶液調製物を含む。これらの調製物は、前記分野で通常使用される不活性希釈剤、例えば水を含むことができる。インスリンおよびヘパリンのための薬物送達システムとしてリボソームも記載されている（米国特許第4, 239, 754号）。つい最近、混合アミノ酸の人工ポリマー（プロテインイド）のマイクロスフェアが医薬品を送達するために使用された（米国特許第4, 925, 673号）。さらに、米国特許第5, 879, 681号および米国特許第5, 871, 753号に記載されている担体化合物であって、生物活性薬剤を経口送達するために使用される担体化合物は、当技術分野において公知である。

【0287】

粘膜用製剤および投与

生物活性薬剤を経口投与するための製剤であって、マイクロカプセルを生じさせるように1つまたは複数の生体適合性ポリマーまたはコポリマー賦形剤に、好ましくは、1つの生体分解性ポリマーまたはコポリマーにカプセル化されており、活性薬剤が、結果として生じるマイクロカプセルの適正なサイズのため、動物の、他に「パイエル板」または「GALT」としても公知の集合リンパ小節に到達し吸収され、胃腸管を通過した薬剤に起因する有効性の損失のない、製剤。同様の集合リンパ小節を、気管支（bronchial tube）（BALT）および大腸において見いだすことができる。上記組織は、一般に粘膜関連リンパ組織（mucosally associated lymphoreticular tissue）（MALT）と称される。粘膜表面による吸収のために、少なくとも1つのタンパク質足場を投与する組成物および方法は、複数のサブミクロン粒子を含むエマルジョンと、粘膜付着性高分子と、生理活性ペプチドと、水性連続相とを含み、エマルジョン粒子の粘膜付着を達成することにより粘膜表面による吸収を促進する（米国特許第5, 514, 670号）。本発明のエマルジョンの適用に好適な粘膜表面は、角膜、結膜、頬側、舌下、経鼻、経膈、経肺、胃、腸および直腸投与経路を含むことができる。経膈または直腸投与用の製剤、例えば坐剤は、賦形剤として、例えば、ポリアルキレングリコール、ワセリン、カカオ脂などを含むことができる。鼻腔内投与用の製剤は、固体であってもよく、賦形剤として例えばラクトースを含むことができ、または点鼻薬の水性もしくは油性溶液であってもよい。頬側投与のための賦形剤は、糖、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、アルファ化デンプン（pregelinated starch）などを含む（米国特許第5, 849, 695号）。

【0288】

経皮製剤および投与

経皮投与のために、少なくとも1つのタンパク質足場は、リボソームもしくはポリマーナノ粒子、マイクロ粒子、マイクロカプセルまたはマイクロスフェア（別段の記述がない限り、まとめてマイクロ粒子と称される）などの、送達デバイスにカプセル化される。合成ポリマー、例えば、ポリヒドロキシ酸、例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびこれらのコポリマー、ポリオルトエステル、ポリ無水物、およびポリホスファゼン、ならびに天然ポリマー、例えば、コラーゲン、ポリアミノ酸、アルブミンおよび他のタンパク質、アルギネートおよび他の多糖類、ならびにこれらの組み合わせで作製されたマイクロ粒子を含む、多数の好適なデバイスが公知である（米国特許第5, 814, 599号）。

【0289】

長期投与および製剤

長期間にわたって、例えば、単回投与から1週間～1年の期間、本発明の化合物を被験体に送達することが、望ましいこともある。様々な緩徐放出、デポーまたはインプラント剤形を利用することができる。例えば、剤形は、体液への低い溶解度を有する化合物の薬学的に許容される非毒性塩、例えば、（a）リン酸、硫酸、クエン酸、酒石酸、タンニン酸、パモ酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンモノもしくはジスルホン酸、ポリガラクトロン酸などの多塩基酸との、酸付加塩（acid addition salt）；（b）亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅

、コバルト、ニッケル、カドミウムなどの多価金属陽イオンとの塩、または例えばN，N'-ジベンジル-エチレンジアミンもしくはエチレンジアミンから形成された、有機陽イオンとの塩；または（c）（a）と（b）の組み合わせ、例えば、亜鉛タンニン酸塩を含有することができる。加えて、本発明の化合物または、好ましくは、今述べたものなどの比較的不溶性の塩を、注射に好適なゲル、例えば、モノステアリン酸アルミニウムの、例えばゴマ油とのゲルに、製剤化することができる。特に好ましい塩は、亜鉛塩、亜鉛タンニン酸塩、パモ酸塩などである。注射用の別のタイプの緩徐放出デポー製剤は、例えば米国特許第3,773,919号に記載されているようなポリ乳酸／ポリグリコール酸ポリマーなどの、緩徐分解性、非毒性、非抗原性ポリマーへのカプセル化のために分散される化合物または塩を含有する。化合物または、好ましくは、上記のものなどの比較的不溶性の塩を、特に動物での使用のために、コレステロールマトリクスシラスティックペレットに製剤化することもできる。さらなる緩徐放出、デポーまたはインプラント製剤、例えば、気体または液体リポソームが、文献で公知である（米国特許第5,770,222号および「Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems」、J. R. Robinson編、Marcel Dekker, Inc.、N. Y.、1978年）。

10

【0290】

養子細胞療法としての修飾細胞の注入

本開示は、本開示の1つまたは複数のCARおよび／またはCAR Ty r i nを発現する修飾細胞であって、それを必要とする被験体に投与するために選択および／または増殖された修飾細胞を提供する。本開示の修飾細胞は、室温および体温を含む任意の温度で保管するために製剤化することができる。本開示の修飾細胞は、凍結保存およびその後の解凍のために製剤化することができる。本開示の修飾細胞は、滅菌包装からの被験体への直接投与のために薬学的に許容される担体中で製剤化することができる。本開示の修飾細胞は、最低レベルの細胞機能およびCAR／CAR Ty r i n発現を保証するための細胞生存度および／またはCAR／CAR Ty r i n発現レベルの指示薬とともに薬学的に許容される担体中で製剤化することができる。本開示の修飾細胞は、さらなる増殖を阻害するためのおよび／または細胞死を防止するための1つまたは複数の試薬とともに処方された密度で薬学的に許容される担体中で製剤化することができる。

20

【0291】

誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド

本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは、既存の誘導性ポリペプチドより優れている。なぜなら、本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのほうが、はるかに免疫原性が低いからである。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは、組換えポリペプチドであり、したがって、天然に存在しないが、本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを産生するように組み換えられる配列は、宿主ヒト免疫系が「非自己」と認識し、その結果、本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを含む細胞、または誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドもしくは誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを含む細胞を含む組成物を受容する被験体において、免疫応答を誘導する可能性がある、非ヒト配列を含まない。

30

40

【0292】

本開示は、リガンド結合領域と、リンカーと、アポトーシス促進性ペプチドとを含む、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドであって、非ヒト配列を含まない誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを提供する。ある特定の実施形態では、非ヒト配列は、制限部位を含む。ある特定の実施形態では、アポトーシス促進性ペプチドは、カスパーゼポリペプチドである。ある特定の実施形態では、カスパーゼポリペプチドは、カスパーゼ9ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、カスパーゼ9ポリペプチドは、切断型カスパーゼ9ポリペプチドである。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは、天然に存在しないものでありうる。

【0293】

50

本開示のカスパーゼポリペプチドは、これらに限定されないが、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、およびカスパーゼ14を含む。本開示のカスパーゼポリペプチドは、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9およびカスパーゼ10を含む、アポトーシスに関連するカスパーゼポリペプチドを含むが、これらに限定されない。本開示のカスパーゼポリペプチドは、カスパーゼ2、カスパーゼ8、カスパーゼ9およびカスパーゼ10を含む、アポトーシスを開始させるカスパーゼポリペプチドを含むが、これらに限定されない。本開示のカスパーゼポリペプチドには、カスパーゼ3、カスパーゼ6およびカスパーゼ7を含む、アポトーシスを実行するカスパーゼポリペプチドを含むが、これらに限定されない。

10

【0294】

本開示のカスパーゼポリペプチドは、野生型アミノ酸または核酸配列と比較して1つまたは複数の修飾を有するアミノ酸または核酸配列によりコードされていてもよい。本開示のカスパーゼポリペプチドをコードする核酸配列を、コドン最適化することができる。本開示のカスパーゼポリペプチドのアミノ酸および／または核酸配列への1つまたは複数の修飾は、野生型アミノ酸または核酸配列と比較して、本開示のカスパーゼポリペプチドの相互作用、架橋、交差活性化、または活性化を増加させることができる。あるいは、または加えて、本開示のカスパーゼポリペプチドのアミノ酸および／または核酸配列への1つまたは複数の修飾は、野生型アミノ酸または核酸配列と比較して、本開示のカスパーゼポリペプチドの免疫原性を減少させることができる。

20

【0295】

本開示のカスパーゼポリペプチドは、野生型カスパーゼポリペプチドと比較して切断されたものであり得る。例えば、カスパーゼポリペプチドは、本開示の誘導性カスパーゼポリペプチドを含む細胞においてアポトーシスを開始させることに加えて局所炎症応答を活性化する可能性を除去または最小化するために、カスパーゼ活性化および動員ドメイン（CARD）をコードする配列が除去されるように切断されたものであり得る。本開示のカスパーゼポリペプチドをコードする核酸配列をスプライシングして、野生型カスパーゼポリペプチドと比較して本開示のカスパーゼポリペプチドの改変体アミノ酸配列を形成することができる。本開示のカスパーゼポリペプチドは、組換えおよび／またはキメラ配列によりコードされていてもよい。本開示の組換えおよび／またはキメラカスパーゼポリペプチドは、1つまたは複数の異なるカスパーゼポリペプチドからの配列を含んでもよい。あるいは、または加えて、本開示の組換えおよび／またはキメラカスパーゼポリペプチドは、1種または複数の種からの配列（例えば、ヒト配列および非ヒト配列）を含んでもよい。本開示のカスパーゼポリペプチドは、天然に存在しないものでありうる。

30

【0296】

本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのリガンド結合領域は、本開示の第1の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドと本開示の第2の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの二量体化であって、アポトーシス促進性ポリペプチドの架橋および細胞におけるアポトーシスの開始を活性化または誘導する二量体化を助長または促進する、いずれのポリペプチド配列を含んでもよい。

40

【0297】

リガンド結合（「二量体化」）領域は、天然または非天然リガンド（すなわち、誘導剤）、例えば非天然合成リガンドを使用して誘導が可能になる、いずれのポリペプチドまたはその機能性ドメインを含んでもよい。リガンド結合領域は、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの性質およびリガンド（すなわち、誘導剤）の選択に依存して、細胞膜の内側にあっても、外側にあってもよい。受容体を含む、多種多様なリガンド結合ポリペプチドおよびそれらの機能性ドメインが、公知である。本開示のリガンド結合領域は、受容体からの1つまたは複数の配列を含んでもよい。特に興味深いのは、リガンド（例えば、低分子有機リガンド）が公知であるか、または容易に産生されうる、リガンド結合領域であ

50

る。これらのリガンド結合領域または受容体は、これらに限定されないが、FKBPおよびシクロフィリン受容体、ステロイド受容体、テトラサイクリン受容体などはもちろん、「非天然」受容体も含むことができ、「非天然」受容体は、抗体、特に重鎖または軽鎖サブユニット、それらの変異した配列、確率的手順、コンビナトリアル合成などにより得られるランダムアミノ酸配列から得ることができる。ある特定の実施形態では、リガンド結合領域は、FKBPリガンド結合領域、シクロフィリン受容体リガンド結合領域、ステロイド受容体リガンド結合領域、シクロフィリン受容体リガンド結合領域 (a c y c l o p h i l i n r e c e p t o r s l i g a n d - b i n d i n g r e g i o n)、およびテトラサイクリン受容体リガンド結合領域からなる群より選択される。

【0298】

1つまたは複数の受容体ドメインを含むリガンド結合領域は、天然ドメインまたはその切断型活性部分のいずれかとしての、少なくとも約50アミノ酸、かつ約350アミノ酸未満、通例、200アミノ酸未満でありうる。結合領域は、例えば、小さい（ウイルスベクターでの効率的トランスフェクションを可能にするために、<25kDa）こともあり、単量体であることもあり、非免疫原性であることもあり、二量体化できるように構成されうる、合成により入手可能な、細胞透過性、非毒性リガンドを有することもある。

【0299】

1つまたは複数の受容体ドメインを含むリガンド結合領域は、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの設計および適切なリガンド（すなわち、誘導剤）の利用可能性に依存して、細胞内にあることもあり、または細胞外にあることもある。疎水性リガンドについては、結合領域は、膜のどちら側にあってもよいが、親水性リガンド、特にタンパク質リガンドについては、結合領域は、結合に利用可能である形態でリガンドを内在化するための輸送システムがある場合を除き、通常は細胞膜の外側にある。細胞内受容体については、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチド、または誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを含むトランスポゾンもしくはベクターは、受容体ドメイン配列の5'もしくは3'にシグナルペプチドおよび膜貫通ドメインをコードすることもあり、または受容体ドメイン配列の5'に脂質結合シグナル配列を有することもある。受容体ドメインが、シグナルペプチドと膜貫通ドメインの間にある場合、受容体ドメインは、細胞外にある。

【0300】

抗体および抗体サブユニット、例えば、重鎖または軽鎖、特に、断片、より特に、可変領域のすべてもしくは一部、または高アフィニティー結合を生じさせるために重鎖と軽鎖の融合体を、本開示のリガンド結合領域として使用することができる。企図される抗体は、免疫応答を誘発せず、一般に、末梢（すなわち、CNS/脳領域の外側）で発現されない細胞外ドメインなどの、異所的に発現されたヒト産物であるものを含む。そのような例は、低アフィニティー神経成長因子受容体 (L N G F R)、および胚性表面タンパク質（すなわち、癌胎児抗原）を含むが、これらに限定されない。またさらに、生理的に許容されるハプテン分子に対する抗体を調製し、個々の抗体サブユニットを結合アフィニティーについてスクリーニングすることができる。サブユニットをコードするcDNAを単離し、定常領域の欠失、可変領域の複数の部分の欠失、可変領域の変異誘発などにより修飾して、リガンドに対する適切なアフィニティーを有する結合タンパク質ドメインを得ることができる。このようにして、ほぼあらゆる生理的に許容されるハプテン化合物を、リガンドとして、またはリガンドのエピトープを得るために、用いることができる。結合領域またはドメインが公知であり、結合のための有用なまたは公知のリガンドがある、天然受容体を、抗体ユニットの代わりに用いることができる。

【0301】

受容体を多量体化するために、誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのリガンド結合領域/受容体ドメインのリガンドは、該リガンドが、リガンド受容体領域に各々が結合できる少なくとも2つの結合部位を有することができるという意味で、多量体のもの（すなわち、第1の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのリガンド結合領域に結合することができる第1の結合部位、および第2の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのリガ

10

20

30

40

50

ド結合領域に結合することができる第2の結合部位を有し、第1および第2の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのリガンド結合領域が同一であるかまたは異なる、リガンド)であってもよい。したがって、本明細書で使用される用語「多量体リガンド結合領域」は、多量体リガンドに結合する、本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドのリガンド結合領域を指す。本開示の多量体リガンドは、二量体リガンドを含む。本開示の二量体リガンドは、リガンド受容体ドメインに結合することができる2つの結合部位を有することができる。ある特定の実施形態では、本開示の多量体リガンドは、個々の分子が、通常は、少なくとも約150Da、かつ約5kDa未満、通例、約3kDa未満である、小さい合成有機分子の二量体またはより高次のオリゴマー、通常は約四量体以下である。合成リガンドと受容体の様々なペアを用いることができる。例えば、天然受容体を含む実施形態では、二量体FK506をFKBP12受容体とともに使用することができ、二量体化シクロスポリンAをシクロフィリン受容体とともに、二量体化エストロゲンをエストロゲン受容体とともに、二量体化グルココルチコイドをグルココルチコイド受容体とともに、二量体化テトラサイクリンをテトラサイクリン受容体とともに、二量体化ビタミンDをビタミンD受容体とともに、などを使用することができる。あるいは、より高次のリガンド、例えば、三量体のものを使用することができる。非天然受容体、例えば、抗体サブユニット、修飾された抗体サブユニット、可撓性リンカーによって隔てられているタンデムでの重鎖可変領域および軽鎖可変領域からなる一本鎖抗体、または修飾された受容体およびそれらの変異した配列などを含む実施形態のために、多種多様な化合物のいずれを使用してもよい。本開示の多量体リガンドを含むユニットの有意な特徴は、各結合部位が、高いアフィニティーで受容体に結合することができること、および好ましくは、それらのユニットを化学的に二量体化することができることである。また、方法は、リガンドの疎水性／親水性のバランスをとるために利用可能であり、したがって、それらのリガンドは、大半の適用のために、機能的レベルで血清に溶解することができ、さらに原形質膜を通過して拡散することができる。

【0302】

本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの活性化を、例えば、誘導剤により媒介される化学誘導二量体化(CID)によって遂行して、条件付きで制御されるタンパク質またはポリペプチドを産生してもよい。本開示のアポトーシス促進性ポリペプチドは、誘導性であるばかりでなく、これらのポリペプチドの誘導は、不安定な二量体化剤の分解または単量体競合阻害剤の投与に起因して、可逆的でもある。

【0303】

ある特定の実施形態では、リガンド結合領域は、FK506結合タンパク質12(FKBP12)ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、リガンド結合領域は、36位にフェニルアラニン(F)からバリン(V)への置換(F36V)を有するFKBP12ポリペプチドを含む。リガンド結合領域が36位にフェニルアラニン(F)からバリン(V)への置換(F36V)を有するFKBP12ポリペプチドを含む、ある特定の実施形態では、誘導剤は、AP1903、合成薬物(CAS索引名:2-ピペリジンカルボン酸、1-[(2S)-1-オキソ-2-(3,4,5-トリメトキシフェニル)ブチル]-1,2-エタンジイルビス[イミノ(2-オキソ-2,1-エタンジイル)オキシ-3,1-フェニレン[(1R)-3-(3,4-ジメトキシフェニル)プロピリデン]]エステル、[2S-[1(R*),2R*[S*[S*[1(R*),2R*]]]]-(9C1)CAS登録番号:195514-63-7;分子式:C₇₈H₉₈N₄O₂₀;分子量:1411.65))を含む。リガンド結合領域が36位にフェニルアラニン(F)からバリン(V)への置換(F36V)を有するFKBP12ポリペプチドを含む、ある特定の実施形態では、誘導剤は、AP20187(CAS登録番号:195514-80-8および分子式:C₈₂H₁₀₇N₅O₂₀)を含むことがある。ある特定の実施形態では、誘導剤は、例えばAP1510などの、AP20187類似体である。本明細書で使用される誘導剤AP20187、AP1903およびAP1510は、交換可能に使用されうる。

10

20

30

40

50

【0304】

AP1903 APIは、Alphora Research Inc.により製造されており、注射用AP1903薬品は、Formatech Inc.により作製されている。これは、非イオン性可溶化剤Solutol HS 15 (250mg/mL、BAS F)の25%溶液中のAP1903の5mg/mL溶液として製剤化される。室温で、この製剤は、透明な、やや黄色い溶液である。冷凍すると、この製剤は、可逆的に相転移を経て、その結果、乳白色の溶液が得られる。この相転移は、再び室温に温めると逆転する。充填量は、3mLガラスバイアルに2.33mL (1バイアル当たり合計おおよそ10mgの注射用AP1903)である。AP1903を投与する必要性を決定する際に、例えば、非DEHP、非エチレンオキシド滅菌注入セットを使用して、IV注入により2時間にわたって単回固定用量の注射用AP1903 (0.4mg/kg)を患者に投与することができる。AP1903の用量は、すべての患者について個別に算出され、体重が $\geq 10\%$ 変動しない限り、再計算されない。その算出用量が、注入前に、0.9%生理食塩水中、100mLで希釈される。AP1903の以前の第I相研究では、24名の健康ボランティアが、2時間にわたってIV注入される0.01、0.05、0.1、0.5および1.0mg/kgの用量レベルでの注射用AP1903の単回用量で処置された。AP1903血漿中レベルは、用量に正比例し、平均C_{max}値は、0.01~1.0mg/kg用量範囲にわたりおおよそ10~1275ng/mLの範囲であった。初回注入期間後、血中濃度は、急速な分布相を示し、血漿中レベルが、用量後0.5、2および10時間の時点で、それぞれ最大濃度のおおよそ18、7および1%に低下した。注射用AP1903は、すべての用量レベルで安全であり、良好に忍容されたことが示され、有利な薬物動態プロファイルを示した。Iulivucci J Dr、J Clin Pharmacol. 41巻:870~9頁、2001年。

【0305】

使用される注射用AP1903の固定用量は、例えば、2時間にわたって静脈内注入される0.4mg/kgでありうる。in vitroで細胞の有効なシグナル伝達に必要なAP1903の量は、10~100nM (1600Da MW)である。これは、16~160 μ g/L、または約0.016~1.6 μ g/kg (1.6~160 μ g/kg)に等しい。1mg/kgまでの用量は、上記のAP1903の第I相研究において良好に忍容された。したがって、0.4mg/kgは、治療用細胞と組み合わせたこの第I相研究のAP1903についての安全かつ有効な用量でありうる。

【0306】

本開示のリガンド結合をコードするアミノ酸および/または核酸配列は、野生型アミノ酸または核酸配列と比較して配列の1つまたは複数の修飾を含有しうる。例えば、本開示のリガンド結合領域をコードするアミノ酸および/または核酸配列は、コドン最適化配列であってもよい。1つまたは複数の修飾は、野生型ポリペプチドと比較して本開示のリガンド結合領域に対するリガンド (例えば、誘導剤) の結合アフィニティを増加させることができる。あるいは、または加えて、1つまたは複数の修飾は、野生型ポリペプチドと比較して本開示のリガンド結合領域の免疫原性を低下させることができる。本開示のリガンド結合領域および/または本開示の誘導剤は、天然に存在しないものでありうる。

【0307】

本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは、リガンド結合領域と、リンカーと、アポトーシス促進性ペプチドとを含み、該誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドは、非ヒト配列を含まない。ある特定の実施形態では、非ヒト配列は、制限部位を含む。リンカーは、アポトーシス促進性ポリペプチドの相互作用および活性化が細胞におけるアポトーシスを開始させるような、アポトーシス促進性ポリペプチドの相互作用、架橋、交差活性化、または活性化を、リガンド結合領域の二量体化時に可能にする、いずれの有機または無機材料を含んでもよい。ある特定の実施形態では、リンカーは、ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、リンカーは、G/Sリッチアミノ酸配列を含むポリペプチド

(「GS」リンカー)である。ある特定の実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列GGGS(配列番号25)を含むポリペプチドである。好ましい実施形態では、リンカーは、ポリペプチドであり、該ポリペプチドをコードする核酸は、制限エンドヌクレアーゼの制限部位を含有しない。本開示のリンカーは、天然に存在しないものでありうる。

【0308】

本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを、細胞において、その細胞における本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの発現を開始および／または調節することができる任意のプロモーターの転写調節下で、発現させることができる。本明細書で用いられる用語「プロモーター」は、遺伝子を転写するためのRNAポリメラーゼの最初の結合部位として作用するプロモーターを指す。例えば、本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを、哺乳動物細胞において、哺乳動物細胞における本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの発現を開始および／または調節することができる任意のプロモーターの転写調節下で、発現させることができ、そのようなプロモーターは、これらに限定されないが、天然、内在性、外来性および異種プロモーターを含む。好ましい哺乳動物細胞は、ヒト細胞を含む。したがって、本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドを、ヒト細胞において、ヒト細胞における本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの発現を開始および／または調節することができる任意のプロモーターの転写調節下で、発現させることができ、そのようなプロモーターは、これらに限定されないが、ヒトプロモーターまたはウイルスプロモーターを含む。ヒト細胞における発現のための例示的なプロモーターは、これらに限定されないが、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)前初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復配列、 β -アクチンプロモーター、ラットインスリンプロモーターおよびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターを含み、これらの各々を使用して、本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの高レベルの発現を得ることができる。本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの発現を達成するための、当技術分野において周知である他のウイルスまたは哺乳動物細胞または細菌ファージプロモーターの使用も、企図されるが、ただし、発現レベルが、細胞においてアポトーシスを開始させるのに十分なものであることを条件とする。周知の特性を有するプロモーターを用いることにより、トランスフェクションまたは形質転換後の目的のタンパク質の発現レベルおよび発現パターンを最適化することができる。

【0309】

特異的な生理的または合成シグナルに応答して調節されるプロモーターの選択は、本開示の誘導性アポトーシス促進性ポリペプチドの誘導性発現を可能にすることができる。エクジソンシステム(Invitrogen、Carlsbad、Calif.)は、1つのそのようなシステムである。このシステムは、哺乳動物細胞における目的の遺伝子の発現調節を可能にするように設計される。それは、事実上、導入遺伝子の基礎発現レベルを可能にせず、200倍を超える誘導性(inducibility)を可能にする、厳密に調節された発現メカニズムからなる。このシステムは、Drosophilaのヘテロ二量体エクジソン受容体に基づいており、エクジソンまたは類似体、例えばムリステロン(muristerone)Aが、受容体に結合し、その受容体が、プロモーターを活性化して、下流導入遺伝子の発現をオンにすると、高レベルのmRNA転写物が得られる。このシステムでは、ヘテロ二量体受容体の両方の単量体が1つのベクターから構成的に発現されるが、目的の遺伝子発現を駆動するエクジソン応答性プロモーターは、別のプラスミド上にある。したがって、このタイプのシステムの目的のベクターへの操作は、有用でありうる。有用でありうる別の誘導性のシステムは、Tet-Off(商標)またはTet-On(商標)システム(Clontech、Palo Alto、Calif.)であり、該システムは、元々はGossenおよびBujardにより開発された(GossenおよびBujard、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻：5547～5551頁、1992年；Gossenら、Science、268巻：1766～1769頁、1995年)。このシステムもまた、高レベルの遺伝子発現

をテトラサイクリンまたはテトラサイクリン誘導体、例えばドキシサイクリンに応答して調節することができるようにする。T e t - O n (商標) システムでは、遺伝子発現は、ドキシサイクリンの存在下でオンにされるが、T e t - O f f (商標) システムでは、遺伝子発現は、ドキシサイクリンの非存在下でオンにされる。これらのシステムは、テトラサイクリンオペレーター配列 (テトラサイクリンリプレッサーが結合する) と、テトラサイクリンリプレッサータンパク質という、E. c o l i のテトラサイクリン耐性オペロンに由来する2つの調節エレメントに基づいている。目的の遺伝子は、プラスミド内の、テトラサイクリン応答性エレメントが内部に存在しているプロモーターの後ろにクローニングされる。第2のプラスミドは、T e t - O f f (商標) システム内の、単純ヘルペスウイルスからのV P 1 6 ドメインと野生型テトラサイクリンリプレッサーとで構成されている、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子と呼ばれる調節エレメントを含有する。したがって、ドキシサイクリンの非存在下では、転写は、構成的にオンである。T e t - O n (商標) システムでは、テトラサイクリンリプレッサーは、野生型でなく、ドキシサイクリンの存在下で転写を活性化する。遺伝子療法ベクター産生のために、産生細胞をテトラサイクリンまたはドキシサイクリンの存在下で増殖させ、毒性である可能性のある導入遺伝子の発現を防止することができるように、しかしベクターが患者に導入されたときには遺伝子発現が構成的にオンになるように、T e t - O f f (商標) システムを使用することができる。

10

【0310】

一部の状況では、遺伝子療法ベクターにおける導入遺伝子の発現を調節することが望ましい。例えば、様々な活性強度を有する異なるウイルスプロモーターが、所望の発現レベルに依存して利用される。哺乳動物細胞では、CMV前初期プロモーターが、強力な転写活性化をもたらすために使用されることが多い。CMVプロモーターは、Donnelly, J. J. ら、1997年、Annu. Rev. Immunol. 15巻: 617~48頁において総説されている。あまり強力ではないCMVプロモーターの修飾バージョンも、導入遺伝子の発現レベル低下が所望される場合に使用されてきた。造血細胞における導入遺伝子の発現が所望される場合、MLVまたはMMTVからのLTRなどのレトロウイルスプロモーターが、使用されることが多い。所望される効果に依存して使用される他のウイルスプロモーターは、SV40、RSV LTR、HIV-1およびHIV-2 LTR、アデノウイルスプロモーター、例えばE1A、E2AもしくはMLP領域からのもの、AAV LTR、HSV-TK、ならびにトリ肉腫ウイルスを含む。

20

30

【0311】

他の例では、発生上調節されている、および特定の分化した細胞において活性であるプロモーターが、選択されることもある。したがって、例えば、プロモーターは、多能性幹細胞では活性でなくてもよいが、例えば、その多能性幹細胞が、より成熟した細胞に分化した場合には、そのプロモーターは活性化されうる。

【0312】

同様に、非標的化組織に対する潜在的毒性または望ましくない効果を低下させるために、組織特異的プロモーターが、特異的組織または細胞における転写を果すために使用される。これらのプロモーターは、CMVプロモーターなどのより強力なプロモーターと比較して低減された発現をもたらしうるが、より限られた発現および免疫原性も、もたらしうる (Bojak, A. ら、2002年、Vaccine. 20巻: 1975~79頁; Cazeaux, N. ら、2002年、Vaccine 20巻: 3322~31頁)。例えば、組織特異的プロモーター、例えばPSA関連プロモーターもしくは前立腺特異的腺性カリクレイン、または筋肉クレアチンキナーゼ遺伝子を、必要に応じて使用することができる。

40

【0313】

組織特異的または分化特異的プロモーターの例は、以下のもの: B29 (B細胞)、CD14 (単核球細胞)、CD43 (白血球および血小板)、CD45 (造血細胞)、CD68 (マクロファージ)、デスミン (筋肉)、エラスターゼ-1 (膵腺房細胞)、エンド

50

グリーン（内皮細胞）、フィブロネクチン（分化している細胞、治癒している組織）、および F l t - 1（内皮細胞）、G F A P（アストロサイト）を含むが、これらに限定されない。

【0314】

ある特定の適応症では、遺伝子療法ベクターの投与後、特定の時点で転写を活性化することが望ましい。これは、ホルモンまたはサイトカイン調節可能であるもののようなプロモーターを用いて行われる。使用することができるサイトカインおよび炎症性タンパク質応答性プロモーターは、KおよびTキニノーゲン（Kageyamaら、（1987年）J. Biol. Chem.、262巻、2345～2351頁）、c-fos、TNF- α 、C反応性タンパク質（Arconeら、（1988年）Nucleic Acids Res.、16巻（8号）、3195～3207頁）、ハプトグロビン（Olivieroら、（1987年）EMBO J.、6巻、1905～1912頁）、血清アミロイドA2、C/EBP α 、IL-1、IL-6（PoliおよびCortese、（1989年）Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、86巻、8202～8206頁）、補体C3（Wilsonら、（1990年）Mol. Cell. Biol.、6181～6191頁）、IL-8、 α 1酸性糖タンパク質（ProwseおよびBaumann、（1988年）Mol Cell Biol.、8巻、42～51頁）、 α 1アンチトリプシン、リポタンパク質リパーゼ（Zechnerら、Mol. Cell. Biol.、2394～2401頁、1988年）、アンジオテンシノーゲン（Ronら、（1991年）Mol. Cell. Biol.、2887～2895頁）、フィブリノーゲン、c-jun（ホルボールエステル、TNF- α 、UV照射、レチノイン酸、および過酸化水素により誘導可能）、コラゲナーゼ（ホルボールエステルおよびレチノイン酸により誘導される）、メタロチオネイン（重金属およびグルココルチコイド誘導性）、ストロメリシン（ホルボールエステル、インターロキニン-1およびEGFにより誘導可能）、 α 2マクログロブリンおよび α 1アンチキモトリプシンを含む。他のプロモーターは、例えば、SV40、MMTV、ヒト免疫不全ウイルス（MV）、モロニーウイルス、ALV、エプスタイン・バーウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ヒトアクチン、ミオシン、ヘモグロビン、およびクレアチンを含む。

【0315】

単独でのまたは別のものとの組み合わせでの上記プロモーターのいずれかが、所望される作用に依存して有用でありうると、予想される。プロモーター、および他の調節エレメントは、それらが所望の細胞または組織において機能的であるように選択される。加えて、プロモーターのこのリストを徹底的なものとも限定的なものとも見なすべきではなく、他のプロモーターが、本明細書で開示されるプロモーターおよび方法とともに使用される。

【実施例】

【0316】

（実施例1：P-BCMA-101（別名：抗BCMA CARTyrin（A08））の特徴付け）

本開示のCARTyrinの発現は、CARTyrinをコードする配列のT細胞へのmRNAエレクトロポレーション後に評価された。CARTyrin発現T細胞の機能性は、腫瘍株に対する脱顆粒によって測定された。特徴付けは、機能性との関連をさらにアッセイする。

【0317】

図4はA08 抗BCMA CARTyrinの構造を示す。

【0318】

図5～8は、P-BCMA-101（A08 抗BCMA CARTyrinをコードする）のin vitroおよびin vivoの特徴付けを実証する。

【0319】

A08 CARTyrinのin vitroでの評価は、ヒト初代T細胞のレンチウイルスによる形質導入後の高レベルの表面発現およびBCMA+腫瘍細胞に対する強い細胞傷害性機能（例えば増殖）を実証した（図5A～Cを参照）。in vitroでのこの強力な性能にしたがって、A08 CARTyrinのin vivoで機能する能力を評価した。

【0320】

図6は、A08 CARTyrinを使用するマウスのin vivo研究のための処置スケジュールを示す。この研究の結果は、P-BCMA-101（A08 CARTyrinをコードする）によって処置されたマウスの100%が21日まで生存したことを示す（図7を参照）。21日目の処置された動物のこの完全な生存は、ゼロ腫瘍量（M-タンパク質の存在量によって評価、これは21日目にこれらの動物で検出されなかった）の成果を伴った（図7を参照）。図8は、対照動物ならびにP-BCMA-101によって処置された動物での腫瘍量をさらに示す一連の写真を提供する。A08 CARTyrinを発現する動物は対照と比較して腫瘍量の減少を実証する。

【0321】

（実施例2：ヒト汎T細胞へpiggyBacにより組み込まれたiC9安全スイッチの発現および機能）

Amara 4Dヌクレオフェクターを使用して、4つのpiggyBacトランスポゾンのうちの1つをヒト汎T細胞にヌクレオフェクトした。「模擬」条件を受ける修飾T細胞には、空のpiggyBacトランスポゾンをヌクレオフェクトした。修飾T細胞は、治療剤（CARTyrinをコードする配列）のみを含有するpiggyBacトランスポゾン、または組み込まれているiC9配列と治療剤（CARTyrinをコードする配列）とを含有するpiggyBacトランスポゾンのいずれかを受けた。

【0322】

図8は、リガンド結合領域と、リンカーと、切断型カスパーゼ9ポリペプチドとを含有するiC9安全スイッチの模式図を提供するものである。具体的には、iC9ポリペプチドは、36位にフェニルアラニン（F）からバリン（V）への置換（F36V）を含むFK506結合タンパク質12（FKBP12）ポリペプチドを含む、リガンド結合領域を含有する。iC9ポリペプチドのFKBP12ポリペプチドは、GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDS SRDRNKP FKFMLG KQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIAYGATGHPGII PPHATLVFDVELL KLE（配列番号23）を含むアミノ酸配列によりコードされる。iC9ポリペプチドのFKBP12ポリペプチドは、GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTTCACCAAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGGGGCCAGACTTGCCTCGTGCAATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTGGACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTTCATGCTGGGAAGCAGGAAGTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCCTGGCACAGATGTCTAGTCCGGCCAGCGGGCCAAACTTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAA CAGGCCACCCAGGGATCATTTCCCCCTCATGCCACCCCTGGTCTTCGAT GTGGAACTGCTGAAGCTGGAG（配列番号24）を含む核酸配列によりコードされる。iC9ポリペプチドのリンカー領域は、GGGGS（配列番号25）を含むアミノ酸、およびGGAGGAGGAGGATCC（配列番号26）を含む核酸配列によりコードされる。iC9ポリペプチドのリンカー領域をコードする核酸配列は、GFGDVGALES LRGNADLAYISLMEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLR RRFSS LHF MV E V K G D L T A K K M V L A L L E L A Q Q D H G A L D C C V V V I L S H G C Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I

10

20

30

40

50

FEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLF
 FFKTS（配列番号27）を含むアミノ酸によりコードされる。iC9ポリペプチドの
 リンカー領域をコードする核酸配列は、TTTGGGGACGTGGGGGGCCCTGG
 AGTCTCTGCGAGGA AATGCCGATCTGGCTTACATCCTGAG
 CATGGAACCCCTGCGGCCCACTGTCTGATCATTAACAATGTG
 AACTTTCTGCAAGAGAAAGCGGACTGCGAACAACGGACTGGCT
 CCAATATTGACTGTGAGAAAGCTGCGGAGAAAGGTTCTCTAG
 TCTGCACTTTATGGTTCGAAGTGA AAGGGGATCTGACCGCC
 AAGAAAATGGTGTCTGGCCCTGCTGGAAGCTGGCTCAGCAGG
 ACCATGGAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTTCGTGATCCTGTCTC
 CCACGGGGTGCCAGGCTTCTCATCTGCAAGTTCCCCGGAGCA
 GTGTACGGAACAGACGGCTGTCTCTGTGACGCTGGAGAAAG
 TCGTCAACATCTTTCAACGGGCACTTCTTTGCCCTAGTCTGGG
 GGGAAAGCCCAA AACTGTCTTTATCCAGGCCCTGTGGCGGG
 GAACAGAAAGATCACGGGCTTCGAGGTGGCCAGCACCCAGCC
 CTGAGGACGAATCACCCAGGGAGCAACCCTGAACCAAGATGC
 AACTCCATTTCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAAGCTG
 GATGCTATCTCAAGCCCTGCCCACTCCTAGTGACATTTTTCG
 TGTCTTTACAGTACCTTCCCAAGGCTTTTGTCTCATGGCGCGA
 TCCCAAGTCAAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGAC
 ATCTTTTGAACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCC
 TGCTGCTGCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCAT
 CTACAAACAGATGCCCGGGTGTCTTCAATTTTCTGAGAAAG
 AAACCTGTCTTTTAAGACTTCC（配列番号28）を含む核酸配列によりコ
 ードされる。

【0323】

iC9安全スイッチを試験するために、4つの修飾されたT細胞の各々を、0、0.1
 nM、1nM、10nM、100nM、または1000nMのAP1903（AP190
 3は誘導剤）とともに24時間インキュベートした。蛍光インターカレーターである7-
 アミノアクチノマイシンD（7-AAD）を、アポトーシスを受ける細胞のマーカーとし
 て使用して、フローサイトメトリーにより、生存度を評価した。

【0324】

細胞生存度は、12日目に評価した（図9を参照されたい）。データは、iC9構築物
 を含有する細胞における誘導剤の濃度増加に伴って右下から左上象限への細胞集団のシフ
 トを示すが、この効果は、iC9構築物を欠く細胞（CARTyrinのみを受けたもの
 ）では観察されず、これらの細胞は、誘導剤の濃度に関係なく、これら2つのエリア間に
 均等に分布している。さらに、細胞生存度を19日目に評価した（図10を参照されたい
 ）。データは、図9（ヌクレオフェクション後12日目）に示されているのと同じ傾向を
 見せるが、左上象限への集団のシフトは、このより遅い時点（ヌクレオフェクション後1
 9日目）でのほうが顕著である。

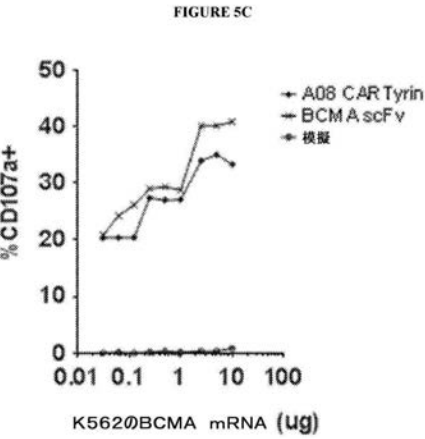
【0325】

凝集結果の定量を行った。それを図11に提供する。この図11は、12日目（図9お
 よび左のグラフ）または19日目（図10および右のグラフ）のいずれかにおける細胞生
 存パーセントに対するiC9安全スイッチの有意な影響を、各々の修飾された細胞型につ
 いてiC9スイッチの誘導剤（AP1903）の濃度の関数として示す。iC9安全スイ
 ッチの存在は、大多数の細胞において12日目までにアポトーシスを誘導し、その効果は
 、19日目までによりいっそう著しくなる。

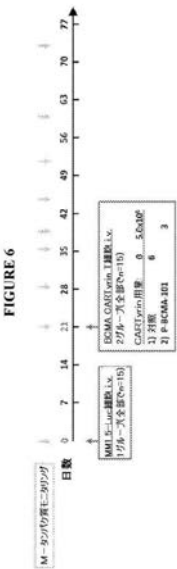
【0326】

この研究の結果は、iC9安全スイッチが、誘導剤（例えば、AP1903）と接触す
 ると活性細胞の除去に極めて有効であることを示す。なぜなら、AP1903は、本研究

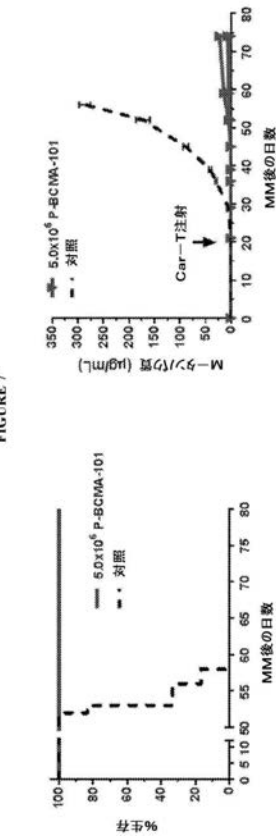
【 図 5 C 】



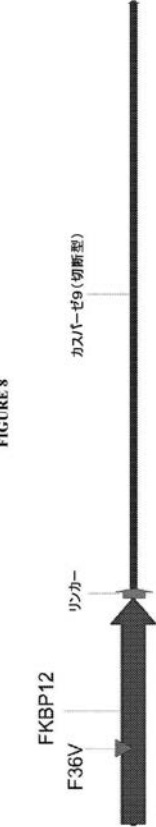
【 図 6 】



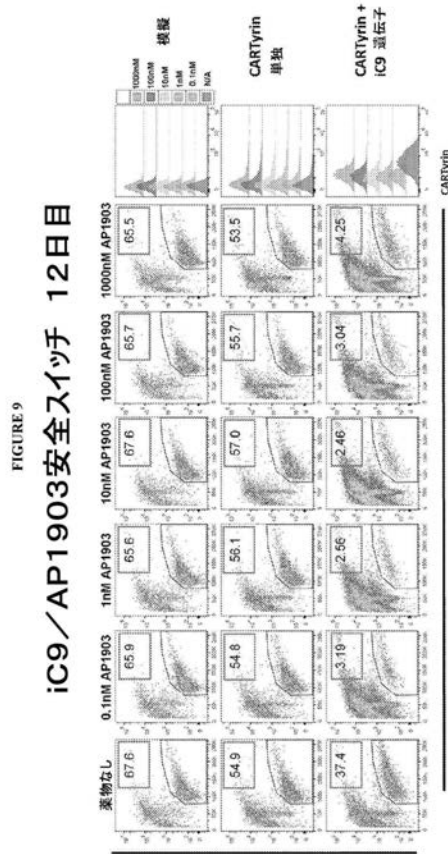
【 図 7 】



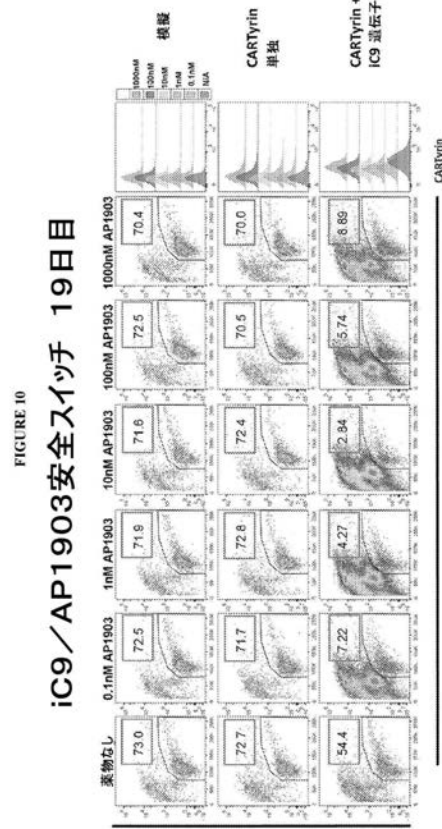
【 図 8 】



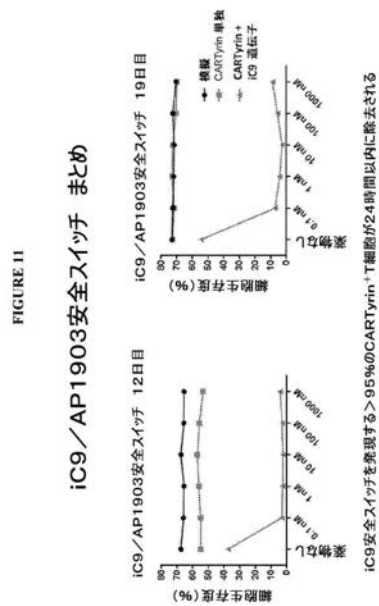
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【配列表】

2019524721000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/042454

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/00 C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anonymous: "Poseida Therapeutics, Inc. Announces Worldwide License Agreement with Janssen to Apply Centyrin Technology in the Development of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Therapies - Poseida Therapeutics", 11 August 2015 (2015-08-11), XP055419951, Retrieved from the Internet: URL: http://poseida.com/2015/08/11/poseida-therapeutics-inc-announces-worldwide-license-agreement-with-janssen-to-apply-centyrin-technology-in-the-development-of-chimeric-antigen-receptor-car-therapies/ [retrieved on 2017-10-27]	1
Y	the whole document ----- -/-	2-233

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 2017

Date of mailing of the international search report

09/11/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fellows, Edward

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/042454

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M. V. MAUS ET AL: "Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies", BLOOD, vol. 123, no. 17, 24 April 2014 (2014-04-24), pages 2625-2635, XP055185132, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2013-11-492231 figure all; example all -----	2-24
Y	M. D. DIEM ET AL: "Selection of high-affinity Centyrin FN3 domains from a simple library diversified at a combination of strand and loop positions", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, vol. 27, no. 10, 30 April 2014 (2014-04-30), pages 419-429, XP055313252, GB ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzu016 figure all; example all -----	25-233
Y	W0 2013/049275 A1 (JANSSEN BIOTECH INC [US]; DIEM MICHAEL [US]; JACOBS STEVEN [US]) 4 April 2013 (2013-04-04) figure all; example all -----	25-233
Y	W0 2010/099301 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; CRAIG NANCY LYNN [US]) 2 September 2010 (2010-09-02) figure all; example all -----	38-233
A	W0 2015/158671 A1 (CELLECTIS [FR]) 22 October 2015 (2015-10-22) figure all; example all -----	1-233

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/042454

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013049275 A1	04-04-2013	AU 2012316080 A1	03-04-2014
		AU 2016269407 A1	22-12-2016
		BR 112014007469 A2	04-04-2017
		CA 2849774 A1	04-04-2013
		CN 103827361 A	28-05-2014
		EA 201490703 A1	30-09-2014
		EP 2761066 A1	06-08-2014
		JP 2014530014 A	17-11-2014
		JP 2017121238 A	13-07-2017
		KR 20140069226 A	09-06-2014
		US 2013079243 A1	28-03-2013
		US 2016041182 A1	11-02-2016
		WO 2013049275 A1	04-04-2013
WO 2010099301 A2	02-09-2010	CN 102421902 A	18-04-2012
		EP 2401376 A2	04-01-2012
		SG 174155 A1	28-10-2011
		US 2011311506 A1	22-12-2011
		US 2014065124 A1	06-03-2014
		US 2017226531 A1	10-08-2017
		WO 2010099301 A2	02-09-2010
WO 2015158671 A1	22-10-2015	AU 2015248956 A1	27-10-2016
		CA 2945620 A1	22-10-2015
		EP 3131927 A1	22-02-2017
		JP 2017513478 A	01-06-2017
		US 2017183418 A1	29-06-2017
		WO 2015158671 A1	22-10-2015

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/861	(2006.01)	C 1 2 N	15/861		Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/864	(2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z		4 H 0 4 5
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00			
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02			
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00			
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04			
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12			
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18			
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/20			
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14			
A 6 1 P	31/06	(2006.01)	A 6 1 P	31/06			
A 6 1 P	33/06	(2006.01)	A 6 1 P	33/06			
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5		
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08			
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00			
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06			
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00			
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00			
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00			
A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7		
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	38/17			
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	47/64			
A 6 1 K	35/761	(2015.01)	A 6 1 K	48/00			
A 6 1 K	9/107	(2006.01)	A 6 1 K	35/76			
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K	35/761			
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	9/107			
A 6 1 K	47/06	(2006.01)	A 6 1 K	9/14			
A 6 1 K	47/30	(2006.01)	A 6 1 K	47/02			
A 6 1 K	47/18	(2006.01)	A 6 1 K	47/06			
A 6 1 K	47/34	(2017.01)	A 6 1 K	47/30			
A 6 1 K	47/44	(2017.01)	A 6 1 K	47/18			
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	47/34			
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	47/44			
A 6 1 K	35/15	(2015.01)	A 6 1 K	35/12			
A 6 1 K	35/13	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z		
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/15			
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	A 6 1 K	35/13			
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H		
			C 1 2 N	15/62	Z		
			C 0 7 K	19/00			

(31)優先権主張番号 62/503,127

(32)優先日 平成29年5月8日(2017.5.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TWEEN

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 オスタータグ, エリック

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, キャンパス ポイント コー
ト 4 2 4 2, スイート 7 0 0

(72)発明者 シェドロック, デボン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, キャンパス ポイント コー
ト 4 2 4 2, スイート 7 0 0

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA93Y AA94X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44

4C076 AA17 AA30 CC01 CC05 CC07 CC11 CC15 CC21 CC26 CC27

CC31 CC34 CC35 CC41 DD21 DD33 DD51 EE01 EE17 EE41

EE51 EE59 FF01 FF11

4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA41 BA44 CA18 CA53 DC50 NA05

NA14 ZA011 ZA012 ZA361 ZA362 ZA591 ZA592 ZB071 ZB072 ZB111

ZB112 ZB131 ZB132 ZB211 ZB212 ZB221 ZB222 ZB261 ZB262 ZB311

ZB312 ZB321 ZB322 ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZB381 ZB382 ZC211

ZC212 ZC551 ZC552 ZC751

4C085 AA03 BB01 EE01 GG02 GG03 GG04 GG06

4C087 AA01 AA02 BB33 BB37 BB64 BB65 BC83 CA04 NA05 NA14

ZA01 ZA36 ZA59 ZB07 ZB11 ZB13 ZB21 ZB22 ZB26 ZB31

ZB32 ZB33 ZB35 ZB38 ZC21 ZC55 ZC75

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA50 EA28 FA74